

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TIAGO WACHESKI

AMOSTRADORES o-DGT PARA A DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES
EMERGENTES EM MATRIZES AQUOSAS

CURITIBA

2017

TIAGO WACHESKI

AMOSTRADORES α -DGT PARA A DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES
EMERGENTES EM MATRIZES AQUOSAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi

CURITIBA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

W113a Wacheski, Tiago
 Amostradores o-DGT para a determinação de contaminantes emergentes em matrizes aquosas / Tiago
 Wacheski. – Curitiba, 2017.
 74 p. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação
em Química, 2017.

Orientador: Marco Tadeu Grassi.

1. Amostrador passivo. 2. GC-MS/MS. 3. Oasis-HLB. 4. Contaminantes emergentes. I. Universidade
Federal do Paraná. II. Grassi, Marco Tadeu. III. Título.

CDD: 543

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

TERMO DE APROVAÇÃO

**AMOSTRADORES O-DGT PARA A DETERMINAÇÃO DE
CONTAMINANTES EMERGENTES EM MATRIZES AQUOSAS**

por

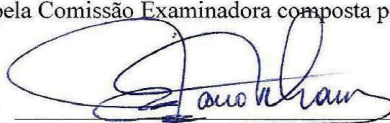
TIAGO WACHESKI

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Vanessa Egéa dos Anjos
Dep. de Química – UEPG



Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de agosto de 2017.

Dedico essa dissertação, com muito amor e gratidão, aos meus pais por me apoiarem não só durante a realização desse trabalho, mas também durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi pela oportunidade em desenvolver essa pesquisa no âmbito do Grupo de Química Ambiental e por toda orientação ao longo dos últimos anos.

À Prof. Dr. Vanessa Egéa dos Anjos por aceitar em ser banca de defesa dessa dissertação. Ainda, agradeço pelos primeiros ensinamentos envolvendo a pesquisa acadêmica durante o meu período de iniciação científica, os quais eu coloco em prática até hoje.

Ao Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva pelas contribuições no exame de qualificação e, também, por aceitar ser parte da banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate pelas sugestões realizadas durante o exame de qualificação.

Aos grupos de pesquisa GQA, TECNOTRATER e GAQQ pela disponibilização de recursos.

As alunas de iniciação científica, Amanda e Barbara, pelo o auxílio durante o desenvolvimento de alguns experimentos ao longo dessa pesquisa.

Aos amigos de laboratório: Rayta, Sheisa, Bianca, Naiara, Natara, Larissa, Suzi, Jéssica, Alecsandra, Liziê, Emerson, Rafael e Amanda pelo apoio, palavras de incentivo, conversas, risadas e abraços. Vocês fizeram os meus dias no laboratório muito melhores.

Aos amigos que a vida me proporcionou, os quais eu tenho como irmãos e irmãs: Ana Carolina, Bárbara, Caio, Eduardo, Emmanuelle, Luize, Marianne, Raíssa, Rayta e Virgínia. Obrigado pela amizade, por despertarem a melhor parte de mim quando estamos juntos e por se fazerem presentes na minha vida.

À psicóloga Denise por me proporcionar um autoconhecimento imensurável no último ano e que foi de extrema importância, tanto no âmbito profissional quanto pessoal.

Aos meus pais, Cleide e Maurilio, por todo o apoio e amor incondicional ao longo da minha vida. Vocês são o meu exemplo de caráter e determinação. Meu amor por vocês é imensurável e tudo o que eu faço é pensando num futuro melhor não só para mim, mas para vocês também.

À minha família, em especial a minha tia Andreia, pelo o amor e apoio.

Aos órgãos de fomento CNPQ, INCTAA, Fundação Araucária e Finep.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Contaminantes emergentes (CE) são substâncias químicas geralmente provenientes de água residuais de origem industrial, agrícola e doméstica. Os CE não estão incluídos em programas de avaliação de qualidade da água e são suspeitos de causar interferência no sistema endócrino de diferentes organismos, incluindo seres humanos. Por esta razão, é relevante estudar a presença de CE em ambientes aquáticos, especialmente no Brasil, onde há deficiências no saneamento básico. O uso de amostradores passivos para a determinação da CE em matrizes aquosas é uma alternativa interessante porque propicia o processo de pré-concentração e fornece concentrações integradas de tempo e resolução espacial. Dentre a gama de amostradores passivos, destaca-se o baseado na difusão em filmes finos por gradiente de concentração para substâncias orgânicas, conhecido como o-DGT, por não necessitar de uma calibração prévia em laboratório. O o-DGT consiste de uma membrana de filtração, um gel difusivo (agarose) e uma fase ligante (gel de agarose contendo um sorvente), onde as substâncias são retidas para posterior determinação analítica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de dispositivos o-DGT para a determinação de contaminantes emergentes em matrizes aquosas. Entre as substâncias escolhidas neste estudo, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A apresentaram maior detectabilidade por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas sequencial (GC-MS/MS) empregando o monitoramento de reações múltiplas (MRM) como modo de aquisição de dados. A fase ligante foi confeccionada com 10% de C₁₈ ou Oasis-HLB (m/v). No entanto, a dispersão da C₁₈ no gel de agarose não foi eficaz devido ao seu caráter hidrofóbico, o que poderia resultar em problemas de reprodutibilidade na sorção dos compostos pela fase ligante. O sorvente Oasis-HLB apresentou melhor dispersão no gel devido ao seu caráter hidrofílico e, conseqüentemente, sua imobilização foi mais bem sucedida. Em vista disso, os testes de sorção e dessorção foram realizados utilizando a fase ligante contendo a HLB frente aos compostos que apresentaram maior detectabilidade por GC-MS/MS. A fase ligante contendo HLB apresentou alta capacidade de sorção, o que diminui o risco de saturação no o-DGT durante longos períodos de amostragem. Entre os solventes de eluição testados, uma mistura 2:1 de acetonitrila/metanol (v/v) apresentou melhor capacidade de dessorção. Três eluições consecutivas de 3 mL de solvente com 2 minutos de sonicação proporcionaram maior massa dessorvida dos compostos. Os coeficientes de difusão para os CE no gel de agarose foram determinados experimentalmente e estavam na faixa dos valores encontrados na literatura para outras substâncias orgânicas. O pH e a força iônica apresentaram influência na sorção de alguns compostos pela fase ligante, o que pode ser devido aos efeitos na partição das substâncias na HLB. Os amostradores o-DGT foram aplicados em amostras de água de torneira e de rio. Os quatro CE foram detectados e quantificados em ambas as amostras após 7 dias de amostragem. Considerando estes aspectos, é possível concluir que o amostrador o-DGT desenvolvido neste estudo está de acordo com os princípios exigidos pela técnica DGT, tornando possível a determinação de CE em matrizes aquosas.

Palavras-chave: Amostrador passivo. GC-MS/MS. Oasis-HLB. Contaminantes emergentes. DGT.

ABSTRACT

Emerging contaminants (EC) are chemical substances commonly derived from industrial, agricultural, and domestic wastewater sources and are not included in water quality assessment programs. EC are suspected of causing interference in the endocrine system of different organisms, including humans. Based on this, it would be relevant to study the presence of EC in aquatic environments, especially in Brazil where there are deficiencies in basic sanitation. The use of passive samplers for EC determination in aqueous matrices is an interesting alternative because it provides a preconcentration process and yields time-weighted average concentrations as well as spatial resolution. Of the range of passive samplers, the diffusive gradients in thin films for organics, known as o-DGT, has the advantage of not requiring previous calibration in the laboratory. The o-DGT consists of a filtration membrane, a diffusive gel (agarose) and a binding phase (agarose gel containing an adsorbent), where the substances are retained for further analytical determination. Therefore, the objective of this work is the development of o-DGT devices for the determination of emerging contaminants in aquatic environments. Among the substances chosen on this study, 4-octylphenol, 4-nonylphenol, triclosan and bisphenol A showed greater detectability by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) using the Multiple Reaction Monitoring as the acquisition mode. The binding phase was made of 1.5% agarose and 10% C₁₈ or Oasis-HLB (m/v). However, the dispersion of the C₁₈ in the gel was not effective due its hydrophobic character, which could result in problems of reproducibility on the sorption of the compounds by the binding phase. Oasis-HLB sorbent presented better dispersion in the gel due to its hydrophilic character and, consequently, its immobilization was more successful. In view of this, the sorption and desorption tests were performed using the HLB binding phase and the compounds that showed greater detectability by GC-MS/MS. The HLB binding phase presented a high sorption capacity, which decreases the risk of saturation in the o-DGT during long periods of sampling. Among the eluting solvents tested, a mixture of 2:1 acetonitrile/methanol (v/v) showed better desorption capacity. Three consecutive elutions of 3 mL of eluent solvent with 2 minutes of sonication provided higher desorbed mass of the compounds. The diffusion coefficients for the EC in the agarose gel were determined experimentally, and they were in the range of the values found on the literature for other organic substances. The pH and ionic strength influenced the sorption of some compounds by the HLB binding phase, which may be due to the effects on the partitioning of the substances in the HLB. The o-DGT samplers were applied in samples of tap and river water. The four CE were detected and quantified in both samples after 7 days of deployment. Considering these aspects, it is possible to conclude the o-DGT sampler developed in this study is in accordance with the principles required by the DGT technique, providing the determination of EC in aqueous matrices.

Keywords: Passive sampler. GC-MS/MS. Oasis-HLB. Emerging contaminants. DGT.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO DO AMOSTRADOR DGT. .	24
FIGURA 2. MAPA INDICANDO O PONTO DE COLETA (EM VERMELHO) E A FOTO DO RIO IRAÍ.....	36
FIGURA 3. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA OBTIDA NO MODO SCAN POR GC-MS/MS PARA UMA SOLUÇÃO MIX DE 13 CONTAMINANTES NA CONCENTRAÇÃO DE 1,00 MG L ⁻¹ APÓS A REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.	37
FIGURA 4. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA OBTIDA NO MODO SIM POR GC-MS/MS PARA UMA SOLUÇÃO MIX DE 13 CONTAMINANTES EMERGENTES NA CONCENTRAÇÃO DE 1,00 MG L ⁻¹ APÓS A REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.	40
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DOS ANALISADORES DE MASSA DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO OPERANDO NO MODO PRODUCT ION SCAN.	41
FIGURA 6. GRAFICOS DA OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO PARA AS TRANSIÇÕES ÍON PRECURSOR > ÍON PRODUTO PARA OS CONTAMINANTES EMERGENTES.	42
FIGURA 7. CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MODO MRM PARA AS SOLUÇÕES MIX DOS 12 CONTAMINANTES NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 5, 10 e 25 µG L ⁻¹	45
FIGURA 8. CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA AS SUBSTÂNCIAS 4-OCTILFENOL, 4 NONILFENOL, TRICLOSAN E BISFENOL A EMPREGANDO O MODO DE AQUISIÇÃO DE DADOS MRM POR GC-MS/MS (n = 4).	47
FIGURA 9. (A) APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DO GEL DE AGAROSE CONSTITUÍDO DE DUAS PLACAS DE VIDRO, SENDO UMA COM DIMENSÃO DE 11 CM x 11 CM E OUTRA COM 11 CM x 10,5 CM, COM ESPAÇADORES DE 0,8 MM; (B) DISCOS DE GEL DE AGAROSE COM DIÂMETRO DE 2,5 CM.	49
FIGURA 10. SOLUÇÃO CONTENDO O GEL DE AGAROSE E C ₁₈ ; (B) DISCOS DE C ₁₈ IMOBILIZADA NO GEL DE AGAROSE COM DIÂMETRO DE 2,5 CM.	50
FIGURA 11. (A) APARATO EXPERIMENTAL CONTENDO A SOLUÇÃO DE GEL DE AGAROSE E HLB ENTRE DUAS PLACAS DE VIDRO, SENDO UMA COM DIMENSÃO DE 11 CM x 11 CM E A OUTRA COM 11 CM x 10,5 CM, COM ESPAÇADORES DE 0,5 MM; (B) DISCOS DE HLB IMOBILIZADA NO GEL DE AGAROSE COM DIÂMETRO DE 2,5 CM.	51

FIGURA 12. MASSA EXTRAÍDA DOS DISCOS DE HLB EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS EM pH $5,8 \pm 0,1$ E FORÇA IÔNICA DE $0,01 \text{ MOL L}^{-1}$ (n=4).....	52
FIGURA 13. VALORES MÉDIOS DE ÁREA DE PICO DE CADA SUBSTÂNCIA DESSORVIDA DO DISCO DE HLB EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES (n=3).....	54
FIGURA 14. VALORES MÉDIOS DAS ÁREAS DE PICO DE CADA SUBSTÂNCIA DESSORVIDA DO DISCO DE HLB EMPREGANDO DIFERENTES NÚMEROS DE ELUIÇÕES COM 3,0 ML DE SOLVENTE ACETONITRILA/METANOL (2:1, V/V) (n=3).....	55
FIGURA 15. VALORES MÉDIOS DAS MASSAS DAS SUBSTÂNCIAS DESSORVIDAS UTILIZANDO DIFERENTES TEMPOS DE SONICAÇÃO (n=3).....	56
FIGURA 16. OBTENÇÃO DO COEFICIENTE ANGULAR POR MEIO DA CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE A MASSA DA SUBSTÂNCIA DIFUNDIDA PELO GEL E O TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO AMOSTRADOR o-DGT NA TEMPERATURA DE $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, FORÇA IÔNICA DE $0,01 \text{ MOL L}^{-1}$ E pH 6,0.....	59
FIGURA 17. VALORES MÉDIOS DAS MASSAS DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS PELA FASE LIGANTE NA FAIXA DE pH ESTUDADO (n=3).	61
FIGURA 18. VALORES MÉDIOS DAS MASSAS DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS PELA FASE LIGANTE NA FAIXA DE FORÇA IÔNICA ESTUDADA (n=3).....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSES DE SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES.	17
TABELA 2. MODOS DE AQUISIÇÃO DE DADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO.	21
TABELA 3. CONTAMINANTES EMERGENTES EM ESTUDO E INFORMAÇÕES DOS PADRÕES UTILIZADOS.	29
TABELA 4. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES POR GC-MS/MS.	31
TABELA 5. MASSA MOLAR APÓS A DERIVATIZAÇÃO E ÍONS DE RAZÃO M/Z ESCOLHIDOS PARA A QUANTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DAS 13 SUBSTÂNCIAS NO MODO SIM.	39
TABELA 6. TRANSIÇÕES ÍON PRECURSOR > ÍON PRODUTO E SUAS ENERGIAS DE COLISÃO (EC) OTIMIZADAS PARA A CRIAÇÃO DO MÉTODO MRM PARA OS 12 CONTAMINANTES EMERGENTES.	44
TABELA 7. TRANSIÇÕES ÍON PRECURSOR > ÍON PRODUTO E SUAS ENERGIAS DE COLISÃO (EC) OTIMIZADAS PARA O PADRÃO INTERNO BISFENOL A-D ₁₆	46
TABELA 8. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURA QUÍMICA DOS CONTAMINANTES EMERGENTES.	53
TABELA 9. CONCENTRAÇÕES DOS CONTAMINANTES EMERGENTES OBTIDAS APÓS 7 DIAS DE AMOSTRAGEM COM O o-DGT NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE TORNEIRA E ÁGUA DE RIO.	65

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

A	- Área do dispositivo
ANOVA	- Análise de variância
BSTFA	- N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
C	- Concentração do analito na matriz
C _e	- Concentração do analito eluído do disco de HLB
C ₁₈	- Octadecilsilano
CID	- <i>Collision-Induced Dissociation</i>
D	- Coeficiente de difusão do analito
D'	- Coeficiente de difusão aparente
DBL	- <i>Diffusive Boundary Layer</i> - camada limítrofe de difusão
DGT	- <i>Diffusive Gradients in Thin Films</i> - difusão em filmes finos por gradiente de concentração
ETE	- Estação de tratamento de esgoto
f _e	- Fator de eluição
GC	- <i>Gas Chromatography</i> – cromatografia a gás
GC-MS	- <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> - cromatografia a gás hifenada a espectrometria de massas
GC-MS/MS	- <i>Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> - cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em tandem
GQA	- Grupo de Química Ambiental
HLB	- <i>Hydrophilic-Lipophilic-Balance</i>
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCTAA	- Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas
LC	- <i>Liquid Chromatography</i> – cromatografia a líquido
LC-MS/MS	- <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i> - cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas em tandem
Log K _{ow}	- Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água
k	- Coeficiente angular
MRM	- <i>Multiple Reaction Monitoring</i> - monitoramento de reações múltiplas
MS	- <i>Mass Spectrometer</i> - espectrômetro de massas
MSTFA	- N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida
MTBSTFA	- N-(terc-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida

M	- Massa do analito acumulado na fase ligante
m/z	- Razão massa/carga
NIST	- <i>National Institute of Standards and Technology</i>
o-DGT	- Amostrador DGT para espécies orgânicas
PES	- Polietersulfona
POCIS	- <i>Polar Organic Chemical Integrative Sampler</i> - Amostradores Integrados para Compostos Orgânicos Polares
PTFE	- Politetrafluoroetileno
Q	- Analisador quadrupolo
q2	- Célula de colisão
QqQ	- Triplo quadrupolo
REACH	- <i>Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> - Regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas
SCAN	- Modo de varredura completa
SIM	- <i>Selected ion monitoring</i> - monitoramento de íon selecionado
SN ₂	- Substituição nucleofílica de segunda ordem
SPE	- Extração em fase sólida
SPMD	- <i>Semipermeable membrane devices</i> - dispositivos baseados em membranas semipermeáveis
t	- Tempo de exposição
TMCS	- Trimetilclorosilano
TMS	- Trimetilsilil
U. S. GS	- <i>United States Geological Survey</i> - Agência de Pesquisas Geológicas dos Estados Unidos
U. S. EPA	- <i>United States Environmental Protection Agency</i> - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
V _e	- Volume final do solvente no vial
Δg	- Espessura da camada de difusão
eV	- Elétron volts
δ	- Espessura da camada limítrofe de difusão
Ω	- Ohm
W	- Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CONTAMINANTES EMERGENTES.....	16
1.2	DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE CONTAMINANTES EMERGENTES	19
1.3	AMOSTRADOR PASSIVO DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (O-DGT)	22
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	REAGENTES, SOLUÇÕES E LIMPEZA DE VIDRARIAS.....	29
3.2	DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	30
3.2.1	Derivatização	30
3.2.2	Parâmetros instrumentais.....	31
3.2.3	Curvas analíticas	32
3.3	PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE.....	32
3.4	IMOBILIZAÇÃO DA C ₁₈ E DA RESINA OASIS HLB NO GEL DE AGAROSE.....	33
3.5	ESTUDO DA CAPACIDADE DE SORÇÃO DA RESINA OASIS HLB IMOBILIZADA NO GEL DE AGAROSE	34
3.6	ESTUDOS DE DESSORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS NO DISCO DE HLB	34
3.6.1	Escolha do solvente, número de eluições e tempo de dessorção no banho ultrassônico	34
3.7	ESTIMATIVA DO FATOR DE ELUIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS PELO DISCO DE HLB	35
3.8	DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO APARENTE DOS CONTAMINANTES EMERGENTES NO GEL DE AGAROSE	35
3.9	EFEITO DO PH E FORÇA IÔNICA NA SORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	35
3.10	APLICAÇÃO DO AMOSTRADOR O-DGT EM MATRIZES AQUOSAS.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS CONTAMINANTES EMERGENTES POR GC-MS/MS	37

4.2	OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO E OBTENÇÃO DO MÉTODO MRM	40
4.3	CURVAS ANALÍTICAS	46
4.4	PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE E IMOBILIZAÇÃO DA C ₁₈ E DA RESINA OASIS HLB	48
4.5	ESTUDO DA CAPACIDADE DE SORÇÃO DA RESINA OASIS HLB IMOBILIZADA NO GEL DE AGAROSE	51
4.6	ESTUDOS DE DESSORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS NO DISCO DE HLB	53
4.6.1	Escolha do solvente, número de eluições e tempo de dessorção no banho ultrassônico	53
4.7	DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO APARENTE DOS CONTAMINANTES EMERGENTES EM GEL DE AGAROSE	57
4.8	EFEITO DO PH E FORÇA IÔNICA NA SORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	61
4.9	APLICAÇÃO DO AMOSTRADOR O-DGT EM MATRIZES AQUOSAS.....	64
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	67
6	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Novos produtos são desenvolvidos para proporcionar maior conforto e segurança nas atividades cotidianas, promovendo uma melhor qualidade de vida para o ser humano. Contudo, muitos destes produtos trazem em sua composição novas substâncias químicas que, frequentemente, não estão incluídas em programas oficiais de avaliação da qualidade ambiental. Além disso, em muitos casos, aspectos como comportamento, destino e efeitos ecotoxicológicos de inúmeras substâncias no ambiente não são bem conhecidos (GEISSEN *et al.*, 2015).

Tais substâncias são denominadas contaminantes químicos emergentes ou contaminantes de preocupação emergente, sendo definidas, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U. S. EPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) (USEPA, 2014) e a Agência de Pesquisas Geológicas dos Estados Unidos (U. S. GS, do inglês *United States Geological Survey*) (USGS, 2014), como qualquer substância de origem sintética ou natural que não é comumente monitorada no ambiente, porém possui potencial de entrar no ambiente, sendo suspeita de causar efeitos adversos aos ecossistemas ambientais e à saúde humana.

Devido ao grande número e variedade de substâncias, os contaminantes químicos emergentes são agrupados em classes que descrevem sua finalidade ou uso (Tabela 1). Algumas classes comuns são os fármacos, produtos de higiene e cuidado pessoal, plastificantes, esteroides e hormônios, entre outros (RAGHAV *et al.*, 2013). À medida que novos métodos de detecção e a síntese de novas substâncias químicas são desenvolvidos, novas classes vêm sendo adicionadas à lista de contaminantes emergente (FARRÉ *et al.*, 2008).

Por meio da mimetização, bloqueio e ruptura da função dos hormônios, os contaminantes emergentes perturbam o sistema endócrino de espécies animais e seres humanos (BOLONG *et al.*, 2009). Dentre os efeitos causados nas espécies animais destacam-se aqueles que podem levar ao declínio da população, como por exemplo, alterações no sistema imunológico de mamíferos, feminização de peixes machos, desenvolvimento anormal do sistema reprodutivo de répteis e aves e a diminuição na eclosão de ovos de pássaros. Nos seres humanos, possíveis efeitos

incluem a diminuição da quantidade de esperma, endometriose e aumento da incidência de câncer de mama, próstata e testículo (MAIA e DEZOTTI, 2007).

TABELA 1. CLASSES DE SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES.

Classe	Exemplo	Definição
Antimicrobianos	Triclosan	Bioquímicos que matam ou inibem o crescimento de micro-organismos, incluindo bactérias e fungos
Metabólitos de detergente	Nonilfenol Octilfenol	Compostos químicos formados quando moléculas de detergente são quebradas pelo tratamento de águas residuais ou degradação no meio ambiente
Plastificantes	Bisfenol A	Aditivos químicos que aumentam a flexibilidade e durabilidade de materiais plásticos
Agrotóxicos	Atrazina	Substâncias químicas utilizadas na agricultura com o intuito de impedir, destruir ou repelir qualquer praga
Hormônios reprodutivos	Testosterona Progesterona Estrona Estradiol 17 β -Estradiol 17 α -Etinilestradiol	Grupo de substâncias químicas, naturais ou sintéticas, cuja função é estimular certas funções reprodutivas

FONTE: Adaptada de RAGHAV *et al.* (2013).

Boa parte destes contaminantes é persistente no meio ambiente e, sendo a ingestão sua rota de exposição majoritária, processos de bioacumulação e biomagnificação podem ocorrer, principalmente para espécies em nível superior da cadeia alimentar, causando assim efeitos adversos mesmo em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) (BOLONG *et al.*, 2009). Mesmo os contaminantes não persistentes podem causar efeitos adversos dependendo da concentração em que se encontram, uma vez que sua alta taxa de transformação e remoção pode ser compensada por sua contínua introdução no ambiente (ICPR, 2010).

Uma das maiores fontes de contaminantes emergentes são águas residuais urbanas não tratadas e, principalmente por meio do descarte de resíduos e águas

residuais resultantes de atividades industriais, agrícolas ou municipais em águas superficiais, uma quantidade significativa destes compostos vem sendo introduzida continuamente nos sistemas aquáticos. Mesmo efluentes de estação de tratamento de esgoto (ETE) podem conter diferentes classes de contaminantes emergentes, dado que as atuais plantas de tratamento não são projetadas para sua completa remoção ou degradação. Deste modo, uma grande quantidade destes compostos e seus metabólitos podem não ser removidos, aportando em sistemas aquáticos (PETROVIĆ, GONZALEZ e BARCELÓ, 2003).

Embora as doses seguras de exposição a estes compostos não sejam conhecidas, iniciativas voltadas a diminuir a quantidade de contaminantes emergentes em matrizes aquosas vêm sendo tomadas. Neste sentido, a Comissão Europeia instituiu um regulamento de registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH), com a finalidade de melhorar a proteção da saúde humana e do meio ambiente contra os riscos que podem ser provocados por produtos químicos. O REACH aplica-se a todas as substâncias químicas e, desta maneira, as empresas devem identificar e gerir os riscos associados às substâncias que fabricam e comercializam na União Europeia (ECHA, 2007).

Em outubro de 2000, o Parlamento e o Conselho da União Europeia estabeleceram uma diretiva do quadro de qualidade de água (2000/60/EC), de maneira que os países membros da UE se comprometem a alcançar uma melhor qualidade de todos os corpos d'água (COM, 2012). Também, investimentos em pesquisa estão sendo realizados a partir de diferentes iniciativas conjuntas internacionais, a fim de unir esforços no desenvolvimento de trabalhos voltados para o aprimoramento dos processos de tratamento de esgoto de forma a remover contaminantes emergentes (WATER JPI, 2014).

No Brasil, os baixos índices de saneamento básico e as deficiências em políticas públicas relacionadas ao tema agravam ainda mais esta questão. Segundo o último atlas de saneamento (IBGE, 2011), cerca de 30% do total de municípios brasileiros lançam esgoto não tratado em rios, lagoas ou lagos, e utilizam estes mesmos corpos receptores para o abastecimento de água, irrigação, aquicultura e recreação.

Integrantes do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), entre eles o Grupo de Química Ambiental (GQA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), publicaram um estudo abordando a

presença de contaminantes emergentes em águas superficiais e destinadas ao abastecimento público. Amostras de água de torneira e de mananciais de 22 capitais brasileiras foram coletadas e analisadas utilizando cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) (MACHADO *et al.*, 2016).

Cafeína, atrazina, triclosan, fenolftaleína e bisfenol A foram encontrados em pelo menos uma das amostras coletadas durante as duas campanhas de coleta. Cafeína e atrazina foram as substâncias mais frequentemente detectadas. Em amostras de água de torneira a concentração da cafeína variou de 1,8 ng L⁻¹ a 2.000 ng L⁻¹, enquanto que para atrazina foram encontrados entre 2,0 e 6,0 ng L⁻¹. Já para amostras coletadas em mananciais, foram encontrados valores de 40 ng L⁻¹ a cerca de 19.000 ng L⁻¹ para a cafeína e de até 15 ng L⁻¹ para a atrazina (MACHADO *et al.*, 2016). Estes resultados reforçam a premissa de que os mananciais estão sendo contaminados pelo lançamento de esgoto sanitário *in natura* e, além disto, que as estações brasileiras de tratamento de água não possuem processos apropriados para a remoção destes tipos de contaminantes. Ainda, este estudo ressalta a importância do emprego de uma técnica analítica que possibilite a determinação e quantificação de substâncias em baixos níveis de concentração, como é o caso dos contaminantes emergentes em matrizes aquosas.

1.2 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE CONTAMINANTES EMERGENTES

Contaminantes emergentes podem ser substâncias novas ou que já estavam presentes no ambiente há um longo período, porém apenas com o desenvolvimento de novos métodos e instrumentos analíticos foram passíveis de detecção (RAGHAV *et al.*, 2013). O pré-requisito para uma avaliação adequada dos riscos e monitoramento da qualidade de água é a escolha de um método que permita medidas em níveis de concentrações muito baixos, como por exemplo, ng L⁻¹ (PETROVIĆ, GONZALEZ e BARCELÓ, 2003).

Técnicas avançadas de análises, como por exemplo a cromatografia a gás (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a cromatografia a líquido (LC, do inglês *Liquid Chromatography*), têm sido utilizadas em análises ambientais, permitindo a determinação de uma ampla gama de compostos que incluem aqueles pertencentes

a classes dos contaminantes emergentes (FATTA *et al.*, 2007). No entanto, métodos envolvendo a cromatografia a líquido são mais susceptíveis aos efeitos de matriz, o que pode prejudicar a quantificação de espécies de interesse em matrizes mais complexas (DAMS *et al.*, 2003).

A cromatografia gasosa é uma técnica com excelente resolução, tornando possível a determinação de várias substâncias em uma mesma amostra. Também, dependendo da matriz analisada, do(s) analito(s) e do detector empregado, baixos limites de detecção podem ser conseguidos. Contudo, esta técnica requer que as substâncias sejam voláteis e termicamente estáveis, caso contrário, é necessário realizar reações de derivatização para que os compostos adquiram essas características. As substâncias são submetidas a uma reação química com reagentes capazes de proporcionar modificações específicas em um ou mais grupos funcionais da molécula (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

A reação de sililação é a mais empregada e envolve a substituição de hidrogênios ativos de grupos funcionais, tais como $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$ e $-SH$, por grupos alquilsilil como o trimetilsilil (TMS) (SEGURA, VENTURA E JURADO, 1998). A reação de sililação ocorre via substituição nucleofílica de segunda ordem (SN_2) e os reagentes comumente empregados são o trimetilclorosilano (TMCS), N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), N-(terc-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA), e N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (HALKET e ZAIKIN, 2003).

Um dos detectores mais poderosos para a cromatografia a gás é o espectrômetro de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometer*). Na cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), as substâncias presentes na amostra na forma de vapor são convertidas a íons com o emprego de uma fonte de ionização. Os íons formados são levados, através de bombas de vácuo, para o analisador de massas, que tem como objetivo a seleção de íons de acordo com sua razão massa/carga (m/z). Os íons são detectados e o sistema de dados gera um gráfico contendo a intensidade do sinal gerado pelo íon *versus* a razão m/z (SKOOG *et al.*, 2006).

Muitos métodos envolvendo a determinação de substâncias pertencentes a classes de contaminantes emergentes empregam a fonte de ionização por elétrons e o analisador de massas do tipo quadrupolo (PIETROGRANDE, BASAGLIA, 2007). Ainda, a técnica relativamente nova envolvendo a cromatografia a gás acoplada a

espectrometria de massas sequencial, ou também denominada em tandem, (GC-MS/MS, do inglês *Gas Chromatography-tandem mass spectrometry*) vem sendo utilizada para a identificação e quantificação de contaminantes orgânicos em amostras ambientais. A GC-MS/MS fornece uma melhor seletividade e sensibilidade quando comparada a cromatografia a gás convencional que apresenta apenas um quadrupolo (ZHANG, BAYEN e KELLY, 2015).

Os espectrômetros de massas que apresentam três quadrupolos em sequência (triplo quadrupolo – QqQ) apresentam dois analisadores quadrupolos que selecionam os íons formados (Q1 e Q3) e um analisador quadrupolo que é empregado como célula de colisão (q2). Os quadrupolos podem operar nos modos de transmissão, varredura e seleção de íon(s) (Tabela 2), e com base nestas configurações, é possível obter uma variedade de espectros de massas (SHIMADZU, 2014).

O modo de varredura completa (SCAN) é realizado selecionando o quadrupolo Q3 de modo a analisar todos os íons formados em uma configurada faixa de m/z. Já no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM), o quadrupolo Q3 permite apenas que somente íons específicos cheguem ao detector, permitindo uma sensibilidade de 10 a 50 vezes maior do que no modo SCAN (SHIMADZU, 2014).

TABELA 2. MODOS DE AQUISIÇÃO DE DADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO.

Modo de aquisição	Q1	q2	Q3
SCAN	Modo de transmissão	Modo de transmissão	SCAN
SIM	Modo de transmissão	Modo de transmissão	SIM
Product Ion Scan	SIM	CID*	SCAN
MRM	SIM	CID*	SIM

FONTE: Adaptado de SHIMADZU (2014).

LEGENDA: *Collision-induced dissociation (CID).

Para análises quantitativas de matrizes complexas desejando uma maior seletividade, é possível a utilização do modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), que se baseia no emprego do modo SIM em cada um dos dois quadrupolos (Q1 e Q3). Neste modo, os íons selecionados em Q1 (íons precursores) só são detectados se produzem um determinado fragmento (íon produto) oriundo de uma reação monitorada. A ausência do modo SCAN nesse modo de aquisição permite

que Q1 e Q3 se concentrem em monitorar os íons precursores e produtos durante períodos de tempo maiores, aumentando a sensibilidade e seletividade do método (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

1.3 AMOSTRADOR PASSIVO DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (o-DGT)

A maioria dos programas de monitoramento aquático dependem da coleta de amostras de água e, muitas vezes, grandes volumes de água precisam ser coletados, pois os poluentes estão presentes em níveis traço (VRANA *et al.*, 2005). Ainda, esta abordagem clássica está sujeita a problemas associados à adulteração da amostra. Esta adulteração pode acontecer devido à contaminação durante as manipulações, perda dos analitos pela instabilidade das espécies e, ainda, perda decorrente da sorção dos mesmos pela superfície dos recipientes utilizados para a amostragem ou estocagem, entre outros (BUFFLE e HORVAI, 2000). Este tipo de amostragem fornece apenas a concentração momentânea do composto no ato da coleta, e deste modo, informações relacionadas com a variação da concentração dos compostos com o tempo, bem como de casos de poluição episódica, acabam sendo ignoradas (VRANA *et al.*, 2005).

Neste contexto, a amostragem passiva representa uma alternativa às técnicas de amostragem tradicionais, sendo uma ferramenta importante na determinação de diversos contaminantes em sistemas aquáticos (VRANA *et al.*, 2005). A amostragem passiva é uma técnica *in situ* que acumula seletivamente espécies lábeis estáveis, proporcionando um processo de pré-concentração que, conseqüentemente, melhora os limites de detecção e minimiza a ocorrência de interferências químicas (LOHMANN e MUIR, 2010).

Diferentes amostradores passivos têm sido desenvolvidos com o intuito de monitorar contaminantes em água, dentre os quais as substâncias orgânicas. Estes amostradores coletam o analito *in situ*, sem afetar as propriedades da água, minimizando os problemas relacionados à possibilidade de contaminação e perda das espécies de interesse. Dependendo do modelo, a massa acumulada reflete tanto a concentração do contaminante em equilíbrio com o amostrador, quanto à

concentração média pela qual o amostrador foi exposto durante certo tempo de amostragem (VRANA *et al.*, 2005).

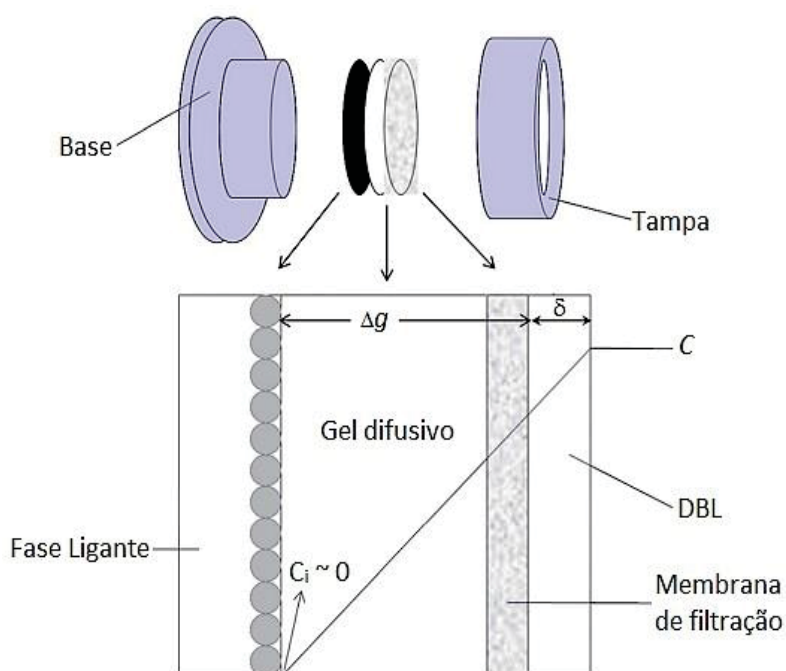
Exemplos de amostradores passivos incluem os dispositivos baseados em Membranas Semipermeáveis (SPMD, do inglês *Semipermeable Membrane Devices*) utilizados na determinação de compostos orgânicos apolares e Amostradores Integrados para Compostos Orgânicos Polares (POCIS, do inglês *Polar Organic Chemical Integrative Sampler*). Contudo, esses amostradores apresentam a desvantagem de necessitar de calibração prévia, pois são altamente dependentes das condições hidrodinâmicas, como vazão da água (CHEN, ZHANG e JONES, 2012).

Dentro da gama de amostradores passivos, destaca-se o baseado na difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT, do inglês *Diffusive Gradients in Thin Films*), justamente por não necessitar de uma calibração. O DGT foi desenvolvido por Davison e Zhang em 1994 para a determinação *in situ* de espécies lábeis inorgânicas em sistemas aquáticos naturais e, desde então, vem sendo também empregado em matrizes como solos, sedimentos e água intersticial (DAVISON E ZHANG, 1994; ZHANG *et al.*, 1995, 1998).

A técnica de amostragem utilizando o DGT é baseada na 1ª Lei de Difusão de Fick, que descreve a difusão da matéria em um meio no qual inicialmente não existe equilíbrio químico. Deste modo, é estabelecido um gradiente de concentração, o que produz um fluxo de espécies que tendem a uniformizar a concentração por toda a extensão da solução (SISSOM e PITTS, 1979).

O analito presente na matriz se difunde através de uma camada limítrofe de difusão, ainda em solução (DBL, do inglês *Diffusive Boundary Layer*, espessura δ), e uma camada de difusão interna do DGT (espessura Δg), compreendida por uma membrana de filtração e um gel difusivo, sendo posteriormente acumulada em uma fase ligante, conforme mostrado na Figura 1.

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO DO AMOSTRADOR DGT.



FONTE: Adaptada de CHEN, ZHANG e DAVISON (2012).

O DGT comercial apresenta como fase ligante a Chelex-100, uma resina bidentada que possui alta afinidade por íons metálicos, e como camada difusiva uma membrana de acetato de celulose e hidrogel de poliacrilamida. Após a amostragem com o DGT, a fase ligante é separada e submetida a uma eluição ácida para ocorrer a dessorção dos metais e, então, é realizada a determinação da concentração por uma técnica analítica adequada (ZHANG e DAVISON, 1995).

A massa (M) do analito acumulado na fase ligante pode ser expressa pela equação (1) (ZHANG e DAVISON, 1995).

$$M = \frac{D C A t}{(\Delta g + \delta)} \quad (1)$$

Sendo D o coeficiente de difusão do analito, C é a concentração do analito na matriz, A é a área do dispositivo, t é o tempo de exposição, Δg é a espessura da camada de difusão no DGT e δ a espessura da DBL. Ainda, rearranjando a equação (1) é possível obter a concentração do analito na matriz empregando a equação (2).

$$C = \frac{M(\Delta g + \delta)}{D A t} \quad (2)$$

A não necessidade de qualquer calibração para o seu uso em ambientes aquáticos acontece devido ao fato da difusão do analito da matriz para dentro do amostrador DGT acontecer exclusivamente pelo gradiente de concentração. A espessura da DBL na interface sólido/líquido pode variar com o fluxo de água na solução podendo interferir na sorção das espécies, contudo este problema pode ser contornado quando a camada de difusão empregada for geralmente mais espessa do que a DBL, tornando os dispositivos DGT muito pouco sensíveis às condições hidrodinâmicas no corpo hídrico, assim o valor da DBL pode ser desconsiderada nos cálculos (ZHANG e DAVISON, 1995).

Nos últimos anos vem crescendo o número de trabalhos empregando materiais alternativos como fase ligante ou gel difusivo de modo a aumentar a aplicabilidade do amostrador ou até mesmo diminuir o seu custo. Neste aspecto, Dos Anjos, Abate e Grassi (2017) investigaram o uso do argilomineral montmorilonita, suportado entre duas membranas de acetato de celulose (0,45 µm), como fase ligante no DGT para determinar a labilidade de diversas espécies metálicas em águas naturais. O DGT modificado apresentou recuperação entre 84±5% a 110±5% para os metais estudados, sendo que o seu desempenho não apresentou diferença significativa (nível de confiança de 95%) em comparação ao DGT comercial.

Quando empregada em amostras de água do rio Iguaçu (Curitiba, Paraná), a montmorilonita apresentou uma relação linear entre a massa acumulada dos metais lábeis com o tempo de imersão do amostrador, indicando que o DGT modificado está de acordo com os princípios da técnica, permitindo a determinação de uma ampla faixa de elementos nessa matriz aquosa (DOS ANJOS, ABATE e GRASSI, 2017).

Com o intuito de aumentar a robustez do método baseado no uso do argilomineral como fase ligante, Chostak *et al.* (2015) propuseram a imobilização da montmorilonita no gel de agarose e a própria agarose como gel difusivo no DGT. O DGT modificado apresentou recuperações de 97% a 102% e foi posteriormente empregado em amostras de água do rio Itajaí-Açu (Ilhota, Santa Catarina) visando a determinação de diferentes espécies metálicas lábeis. As concentrações

determinadas por meio do DGT modificado foram ligeiramente maiores se comparadas às concentrações obtidas pela amostragem com o DGT comercial, o que pode ter sido causado pela maior difusão dos elementos pelos poros menos restritivos do gel de agarose.

Devido à ampla aplicação do amostrador DGT, muitos aspectos dinâmicos, bem como as características difusionais de espécies inorgânicas, estão muito bem estabelecidos para esta técnica de amostragem passiva. Diante disto, todas estas considerações discutidas para a determinação de diferentes espécies inorgânicas poderiam também ser estendidas para a determinação de espécies orgânicas.

Neste contexto, há alguns anos atrás Chen, Zhang e Jones (2012) testaram em laboratório, de maneira pioneira, um amostrador DGT para espécies orgânicas (denominado o-DGT), tendo como camada difusiva uma membrana de polietersulfona e gel de agarose e, como fase ligante, a resina XAD18 imobilizada no gel de agarose. A substituição das partes internas foi necessária para assegurar que a substância orgânica fosse sorvida apenas pela fase ligante e não pela camada difusiva. O composto modelo utilizado foi o antibiótico sulfametoxazol, sendo que este apresentou um coeficiente de difusão no gel de agarose (0,8 mm de espessura) de $3,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 20 °C, determinado experimentalmente empregando-se uma célula de difusão.

A massa de sulfametoxazol acumulada pelo o-DGT aumentou com o tempo de exposição independente dos valores testados de pH (6-9) e força iônica (0,001-0,1 mol L⁻¹). Além disso, as medidas não foram afetadas pela vazão quando o amostrador foi utilizado sob condições não estáticas, o que poderia interferir no valor da espessura da DBL e ocasionar erros no cálculo da concentração, evidenciando, assim, as potencialidades para aplicação do o-DGT em medidas no campo (CHEN, ZHANG e JONES, 2012).

Com base nestes resultados, Chen *et al.* (2013) estudaram o desempenho da configuração previamente proposta do o-DGT em campo. Para isto, amostradores o-DGT foram mantidos no influente e efluente de uma ETE no Reino Unido com o intuito de determinar a concentração de diferentes antibióticos. A partir do uso do o-DGT foi possível quantificar 10 antibióticos com um tempo de amostragem mínimo de 7 dias. Após o desenvolvimento deste estudo, algumas evidências e recomendações sobre o uso do o-DGT como uma ferramenta para monitoramento de rotina para antibióticos foram estabelecidas, e assim, com base nisso seria

possível atingir um melhor desempenho deste amostrador em futuras aplicações em campo.

Tendo em mente o surgimento de novas substâncias químicas a cada dia e o aporte de esgoto não tratado em corpos aquáticos, especialmente no Brasil onde há deficiências no saneamento básico, o desenvolvimento de dispositivos o-DGT proposto neste projeto de pesquisa pode fornecer informações pertinentes acerca da presença de contaminantes emergentes em águas naturais, podendo proporcionar até mesmo futuras ações voltadas ao desenvolvimento e aprimoramento da legislação ambiental envolvendo estes compostos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho propôs como principal objetivo o desenvolvimento de amostradores passivos baseados na técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração para espécies orgânicas, o-DGT, com a finalidade de detectar e determinar contaminantes emergentes em matrizes aquosas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Desenvolver o método cromatográfico para a determinação de compostos orgânicos, pertencentes a algumas classes de contaminantes emergentes, por GC-MS/MS;
- b) Preparar a fase ligante a partir da imobilização dos materiais sortivos (C_{18} ou resina Oasis HLB) no gel de agarose;
- c) Estudar as propriedades sortivas e dessortivas das diferentes fases ligantes frente aos contaminantes emergentes de interesse e avaliar a aplicabilidade das mesmas nos amostradores o-DGT;
- d) Preparar o gel de agarose para ser utilizados como gel de difusão do amostrador e determinar os coeficientes de difusão das espécies químicas de interesse neste material;
- e) Aplicar os amostradores o-DGT em matrizes aquosas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E LIMPEZA DE VIDRARIAS

No início deste estudo foram selecionadas quatorze espécies de interesse a partir de padrões disponíveis em nosso grupo de pesquisa, sendo duas delas deuteradas (Atrazina-D₅ e Bisfenol A-D₁₆) que foram empregadas como padrão interno. As informações dos padrões utilizados estão dispostas na Tabela 3. O reagente derivatizante utilizado foi o N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich, número CAS: 25561-30-2).

TABELA 3. CONTAMINANTES EMERGENTES EM ESTUDO E INFORMAÇÕES DOS PADRÕES UTILIZADOS.

Substância	Fórmula	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Número CAS	Fornecedor	Pureza (%)
Atrazina-D ₅	C ₈ H ₉ ClD ₅ N ₅	220,71	163165-75-1	Fluka	99,6
Atrazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,68	1912-24-9	Fluka	99,9
Bisfenol A-D ₁₆	C ₁₅ D ₁₆ O ₂	244,00	96210-87-6	Supelco	99,9
Bisfenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,00	80-05-7	Supelco	99,9
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	58-08-2	Sigma-Aldrich	<98,5
4-Octilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206,00	1806-26-4	Supelco	99,9
4-Nonilfenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220,35	104-40-5	Fluka	99,9
Triclosan	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	289,54	3380-34-5	Sigma-Aldrich	99,8
Estrona	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,37	53-16-7	Fluka	99,3
17β-Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,38	50-28-2	Sigma-Aldrich	99,3
Testosterona	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288,42	58-22-0	Fluka	99,7
17α-Etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,40	57-63-6	Fluka	99,3
Progesterona	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314,46	57-83-0	Fluka	99,8
Estriol	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,38	50-27-1	Fluka	99,3

FONTE: O autor (2017).

Para a confecção do gel difusivo, foi utilizado um padrão de agarose (marca: Kasvi, número CAS: 9012366). Nos testes de imobilização dos materiais sortivos no gel de agarose foram empregados a fase C₁₈ (octadecilsilano) (marca: Fluka, porosidade de 90 Å e tamanho de partícula de 40 a 63 µm) e a fase Oasis HLB (*Hydrophilic-Lipophilic-Balance*) proveniente de cartuchos de 500 mg utilizados para extração em fase sólida (SPE) (Marca: Waters).

Por meio da pesagem e posterior solubilização em metanol, foram preparadas soluções estoque individuais das substâncias na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. A partir das soluções estoque, soluções de trabalho foram preparadas contendo uma mistura de todas as substâncias, sendo essa mistura denominada solução mix. Tanto as soluções estoque, como também as soluções de trabalho, foram armazenadas em frascos âmbar ou tubos envoltos em papel alumínio para evitar a exposição à luz. Em seguida foram acondicionadas em congelador (-20°C). Todos os solventes utilizados na preparação das soluções, nas análises cromatográficas e limpeza das vidrarias, foram de grau HPLC.

A vidraria não volumétrica foi lavada com detergente neutro e água corrente e foi mantida em solução de Extran (Merck) neutro a 5% (v/v) por 24 h. Posteriormente, o material foi enxaguado exaustivamente com água corrente e em seguida cinco vezes com água destilada e cinco vezes com água ultrapura com resistividade de $18,2 \mu\Omega \text{ cm}$ (Milli-Q Plus, Millipore). Após esta etapa, a vidraria foi deixada em capela de fluxo laminar (Veco, modelo FUV 12) para secagem e posterior enxague com acetona P.A.. Finalmente, a fim de eliminar possíveis resíduos orgânicos, as vidrarias foram deixadas em forno mufla a 400°C por 4 h e, após o resfriamento, foi protegida com papel alumínio e armazenada até a sua utilização.

Para a vidraria volumétrica, o procedimento de limpeza consistiu das mesmas etapas descritas no parágrafo anterior, porém o material não foi levado ao forno mufla. Deste modo, após o enxague com duas alíquotas de acetona P.A., a vidraria foi deixada para secar na cabine de fluxo laminar para em seguida ser guardada até o momento da utilização.

3.2 DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA

3.2.1 Derivatização

Na etapa de derivatização, alíquotas do solvente contendo os contaminantes emergentes foram adicionadas a um vial com capacidade de 2,0 mL e evaporado em um concentrador rotativo a vácuo (Christ, modelo RVC 2-18 CDplus). Em seguida, foram adicionados 20 μL do agente derivatizante BSTFA e a reação de derivatização foi realizada em forno microondas, sob potência de 840 W, por 5 min

(MACHADO, 2015). Por fim, os vials contendo o extrato derivatizado foram mantidos no concentrador rotativo a vácuo até a completa evaporação do BSTFA e a ressuspensão foi feita com 1,0 mL de hexano, seguida da análise por GC-MS/MS.

3.2.2 Parâmetros instrumentais

A determinação dos contaminantes emergentes foi realizada em um cromatógrafo a gás, modelo GCMS2010 Plus da Shimadzu, acoplado a um espectrômetro de massas em tandem com analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ8040) e fonte de ionização por elétrons. A injeção dos compostos foi realizada por meio de um amostrador automático, modelo AOC-5000 Plus (Shimadzu), e a separação cromatográfica foi realizada em uma coluna capilar SH-Rtx-5MS (30 m × 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme), também da Shimadzu. Hélio (5.0) foi empregado como gás de arraste. As demais condições cromatográficas utilizadas foram escolhidas com base em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (MACHADO, 2015) e podem ser visualizadas na Tabela 4.

TABELA 4. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES POR GC-MS/MS.

(continua)

Cromatógrafo a gás	Temperatura do injetor	250 °C
	Modo de injeção	Splitless (3 minutos)
	Pulso de pressão	150 kPa (3 minutos)
	Volume de injeção	1 µL
	Vazão do gás de arraste	1,0 mL min ⁻¹
	Programa de aquecimento da coluna	T = 80 °C por 1 minuto; 10 °C min ⁻¹ até 300 °C e mantido por 10 minutos
	Tempo de corrida	33 minutos
Espectrômetro de massas	Temperatura da linha de transferência	300 °C
	Temperatura da fonte de ionização	250 °C
	Energia de ionização	70 eV

TABELA 4. PARÂMETROS INSTRUMENTAIS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES POR GC-MS/MS.

(conclusão)		
	Analizador de massas	Triplo quadrupolo
Espectrômetro de massas	Modo de registro dos íons	SCAN, SIM, MRM e <i>Product Ion Scan</i>

FONTE: O autor (2017).

Para avaliar a separação e identificação dos compostos com base nas condições cromatográficas utilizadas, inicialmente o espectrômetro de massas foi operado no modo SCAN, com uma faixa de aquisição dos íons variando de m/z 90 a 550. Após a determinação dos íons de razão m/z que poderiam ser utilizados como íons de quantificação e confirmação, foi possível realizar a aquisição do espectro de massas no modo SIM. Para melhor aquisição dos sinais dos compostos no modo SIM, o método de aquisição foi dividido em oito segmentos de aquisição, contendo apenas um ou um conjunto de compostos por segmento. Também, foi realizada a otimização do método instrumental no modo MRM para cada uma das substâncias investigadas.

3.2.3 Curvas analíticas

As curvas analíticas foram construídas periodicamente a partir das soluções mix diluídas contendo as substâncias que apresentaram maior detectabilidade por GC-MS/MS (4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A). Para a quantificação, os níveis de concentração de cada analito foram de 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo utilizado o bisfenol A-D₁₆, na concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, como padrão interno. Todos os pontos da curva foram avaliados em triplicata e expressos em termos da média e barras de estimativa de desvio padrão.

3.3 PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE

A preparação dos discos de gel de agarose empregados como gel difusivo no o-DGT, na proporção de 1,5% (m/v) de agarose, foi realizada seguindo os procedimentos descritos na literatura (COLAÇO *et al.*, 2012; CHEN, ZHANG e JONES, 2012). A agarose foi dissolvida em água ultrapura pré-aquecida e esta mistura foi aquecida até aproximadamente 80 °C sob constante agitação, utilizando

um bastão de vidro, até que a solução se tornasse límpida. A solução do gel foi então vertida, com o auxílio de uma pipeta, entre duas placas de vidro pré-aquecidas contendo espaçadores de 0,8 mm e deixada na capela de fluxo laminar até atingir a sua temperatura de geleificação (36 °C ou menos). Após o resfriamento, o gel foi seccionado em discos com diâmetro de 2,5 cm, imersos numa solução de nitrato de sódio 0,05 mol L⁻¹ e armazenados na geladeira (4 °C).

3.4 IMOBILIZAÇÃO DA C₁₈ E DA RESINA OASIS HLB NO GEL DE AGAROSE

As fases ligantes foram preparadas nas proporções de 10% (m/v) de uma das fases sorventes com 1,5% (m/v) de agarose. Para a imobilização da C₁₈, o procedimento consistiu primeiramente na preparação da solução do gel de agarose, conforme descrito no item 3.3, e então a massa apropriada de C₁₈ foi adicionada à solução. Esta mistura foi vertida entre as placas de vidro pré-aquecidas contendo espaçadores de 0,5 mm, deixada na capela de fluxo laminar para posteriormente ser seccionada em discos com diâmetro de 2,5 cm. Estes discos contendo C₁₈ foram imersos em solução de nitrato de sódio 0,05 mol L⁻¹ e armazenados em refrigerador a 4 °C.

Na imobilização da fase sorvente Oasis HLB foi realizada primeiramente uma etapa de condicionamento. Aos cartuchos SPE foram adicionadas duas alíquotas de 3,0 mL de metanol, seguida pela lavagem com duas alíquotas de 3,0 mL de água ultrapura (Milli-Q). Esta etapa foi realizada com o auxílio de um sistema a vácuo do tipo Manifold, contudo sem a utilização de vácuo. Após o condicionamento, os cartuchos foram mantidos sob fluxo de N₂ (g) por 15 minutos para que o excesso de água retido na fase sorvente pudesse ser eliminado.

Finalmente, a fase sorvente Oasis HLB foi retirada do cartucho, após a remoção do filtro interno, e uma massa adequada foi pesada e adicionada à solução do gel de agarose preparada previamente. A mistura foi vertida entre as duas placas de vidro pré-aquecidas contendo espaçadores de 0,5 mm, deixada na cabine de fluxo laminar até a sua geleificação, seccionada em discos com diâmetro de 2,5 cm e, então, estocados em solução de nitrato de sódio 0,05 mol L⁻¹ e armazenados em refrigerador a 4 °C.

3.5 ESTUDO DA CAPACIDADE DE SORÇÃO DA RESINA OASIS HLB IMOBILIZADA NO GEL DE AGAROSE

Discos de agarose contendo HLB como sorvente foram expostos à várias concentrações de 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A (100, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Utilizando frascos âmbar de 20 mL, os discos foram imersos em 4,00 mL de soluções mix das substâncias em meio aquoso (pH $5,8 \pm 0,1$) e força iônica de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaNO_3). Os frascos foram deixados em um agitador orbital (Tecnal TE-420) por 17h, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 25 °C. A capacidade de sorção do disco de HLB foi avaliada em quadruplicata.

A dessorção das substâncias sorvidas foi realizada com base na metodologia proposta por Chen *et al.* (2013), que consistiu da transferência dos discos de HLB para tubos de ensaio de 10 mL, seguido da adição de 5,00 mL de metanol e dessorção por 20 minutos no banho ultrassônico. Esta etapa foi repetida novamente e as duas frações do solvente foram combinadas e evaporadas utilizando um concentrador rotativo a vácuo (Christ, modelo RVC 2-18 CDplus). Foi feita a ressuspensão das substâncias em 1,00 mL de metanol e posterior filtragem empregando um filtro seringa de politetrafluoroetileno (PTFE) com tamanho de poro de 0,20 μm para, por fim, ser feita a etapa de derivatização e análise por GC-MS/MS.

3.6 ESTUDOS DE DESSORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS NO DISCO DE HLB

3.6.1 Escolha do solvente, número de eluições e tempo de dessorção no banho ultrassônico

Discos contendo HLB foram mantidos imersos por 17h em 5,0 mL de solução mix aquosa $20 \mu\text{g L}^{-1}$ das substâncias 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A em força iônica $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaNO_3) e pH 6,0, sob agitação de 150 rpm a 25 °C. Após este período, os discos foram transferidos para tubos de ensaio de 10 mL e foi realizada a dessorção conforme descrito no item 3.6, contudo empregando diferentes solventes, sendo eles metanol, acetonitrila, acetonitrila/metanol (2:1, v/v), metanol/tolueno/diclorometano (1:1:8, v/v/v) e acetonitrila/acetato de etila (1:1, v/v).

Após a escolha do solvente, foram realizados testes envolvendo o número de eluições. Foram avaliadas de uma a três eluições com 3,00 mL do solvente, utilizando 20 minutos de sonicação em cada eluição. Concluída a avaliação do número de eluições, foi estudado o tempo de dessorção das substâncias retidas no disco empregando o banho ultrassônico durante 2, 5, 10 e 20 minutos. Para ambos os testes, a etapa de sorção das substâncias pelo disco contendo HLB foi realizada nas mesmas condições empregadas no teste da escolha do eluente.

3.7 ESTIMATIVA DO FATOR DE ELUIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS PELO DISCO DE HLB

Em frascos âmbar de 20 mL foram adicionados os discos contendo HLB e 4,0 mL de uma solução mix aquosa das substâncias 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, pH $5,8 \pm 0,1$ e força iônica de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaNO_3). Os frascos foram deixados em um agitador orbital (Tecnal TE-420) por 18h, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 25°C . A dessorção das substâncias foi realizada empregando os parâmetros otimizados no item 3.6.1.

3.8 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO APARENTE DOS CONTAMINANTES EMERGENTES NO GEL DE AGAROSE

Amostradores preparados com discos contendo HLB (10% m/v) de 0,5 mm de espessura e gel de agarose de 0,8 mm foram deixados em contato com uma solução mix aquosa de pH 6,0 e força iônica $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaNO_3) com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A, sob agitação de 750 rpm e temperatura constante, a 25°C . Os amostradores eram retirados da solução em diferentes intervalos de tempo (até 64h) para posterior dessorção das substâncias retidas na fase ligante empregando as condições previamente otimizadas.

3.9 EFEITO DO pH E FORÇA IÔNICA NA SORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

Amostradores o-DGT foram mantidos em contato com soluções contendo as substâncias de interesse na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e empregando diferentes valores de pH (5, 6, 7 e 8) e força iônica (0,001; 0,01; 0,1 e $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3). Para os testes variando o pH, a força iônica foi mantida constante ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e o

ajuste foi realizado utilizando soluções diluídas de HCl e NaOH. Para investigar o efeito da força iônica no desempenho do o-DGT, o pH foi ajustado para 6,0 e utilizado diferentes massas de NaNO_3 para obter a força iônica desejada. Para ambos os experimentos, o tempo de exposição foi de 15h e temperatura controlada de 25 °C.

3.10 APLICAÇÃO DO AMOSTRADOR O-DGT EM MATRIZES AQUOSAS

A aplicação do o-DGT foi realizada em laboratório utilizando amostras de água de torneira e água superficial coletada do rio Iraí. A água de torneira foi coletada de uma das torneiras dispostas no nosso laboratório de pesquisa, sendo que a torneira foi deixada aberta por alguns minutos antes de transferí-la com o auxílio de uma mangueira para o recipiente. Para a amostragem em água de torneira, amostradores foram imersos em cerca de 115 L de amostra sob agitação por meio de uma bomba de aquário. O tempo de amostragem foi de 7 dias, com temperatura ao longo do desenvolvimento do experimento de 21 ± 2 °C e pH 6,8.

Cerca de 60 L de água do rio Iraí foram coletados em julho de 2017 em um ponto situado na cidade de Piraquara, região metropolitana de Curitiba (latitude 25°26'40.6"S; longitude 49°08'33.9" O), como indicado na Figura 2.

FIGURA 2. MAPA INDICANDO O PONTO DE COLETA (EM VERMELHO) E A FOTO DO RIO IRAÍ.



FONTE: Google Maps (2017).

Os procedimentos de coleta e manipulação foram realizados de modo a preservar a integridade da amostra até a chegada ao laboratório. Ao chegar no

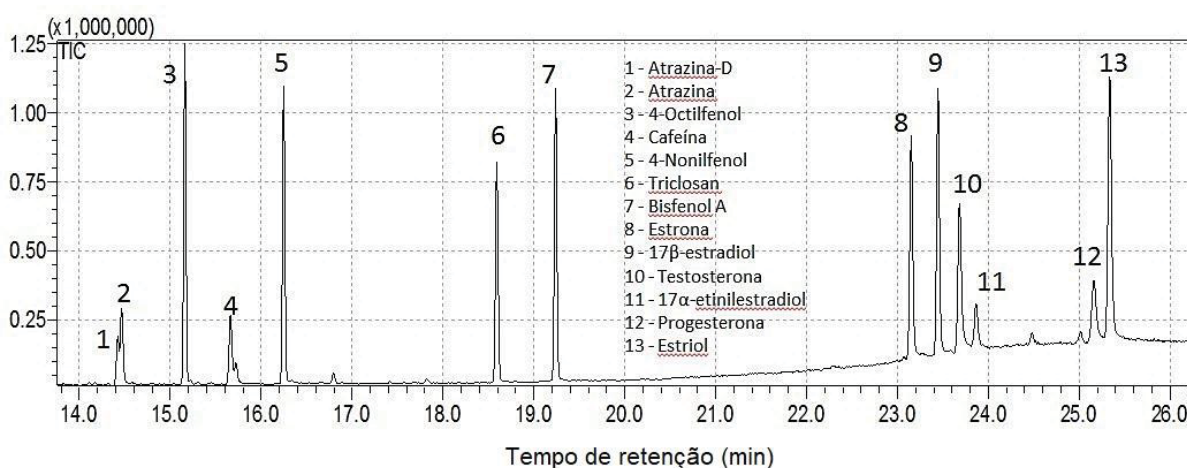
laboratório, a amostra foi filtrada utilizando uma peneira metálica e transferida para um aquário com capacidade de 100 L. A amostra foi agitada empregando a bomba de aquário, o pH medido foi de 7,4 e a temperatura média durante 7 dias foi de $17,3 \pm 0,9$ °C. Após o período de amostragem para ambas as amostras, a etapa de dessorção das substâncias da fase ligante do o-DGT foi executada empregando os parâmetros otimizados no item 3.6.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS CONTAMINANTES EMERGENTES POR GC-MS/MS

Nos estudos iniciais para avaliar a separação dos contaminantes emergentes, bem como identificar cada um deles a partir dos espectros de massas, foi feita a injeção da solução de cada um dos compostos separadamente, e também de uma solução mix, na concentração de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$, operando o espectrômetro de massas no modo SCAN. Previamente, essas soluções foram submetidas a reação de derivatização, de modo a proporcionar maior volatilidade para os compostos por meio da modificação específica em um ou mais grupos funcionais como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ e $-\text{NH}$ na molécula. A Figura 3 apresenta o cromatograma resultante da injeção de uma solução mix dos contaminantes emergentes de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ no modo SCAN.

FIGURA 3. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA OBTIDA NO MODO SCAN POR GC-MS/MS PARA UMA SOLUÇÃO MIX DE 13 CONTAMINANTES NA CONCENTRAÇÃO DE $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ APÓS A REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.



FONTE: O autor (2017).

A partir do cromatograma mostrado na Figura 3 é possível observar que os parâmetros instrumentais empregados proporcionaram uma separação satisfatória para a maioria das substâncias. Sua identificação foi feita comparando-se o espectro de massas de cada pico cromatográfico com os espectros de massas presentes na biblioteca do National Institute of Standards and Technology (NIST®) disponibilizado pelo software *GCMSsolution* (versão 4.20).

Como a única diferença na estrutura molecular da atrazina e seu par isotópico, atrazina-D₅, é a substituição de cinco átomos de hidrôgenio pelo seu isótopo, essas substâncias apresentaram picos cromatográficos parcialmente sobrepostos. Contudo, esse problema de coeluição dos picos das substâncias pode ser contornado com a utilização do espectrômetro de massas no modo SIM, onde é possível monitorar íons com valores específicos de razão m/z e, desta forma, diferenciar as substâncias que sofrem coeluição.

Para análise no modo SIM foram utilizados os mesmos parâmetros cromatográficos empregados no modo SCAN, contudo foi preciso estabelecer os valores de m/z para os íons de quantificação e confirmação. Para o íon de quantificação de uma substância, geralmente, é escolhido o íon de razão m/z de maior intensidade, enquanto para o íon de confirmação é escolhido o segundo de maior intensidade. Além disso, é preciso atentar-se a estabilidade do íon para que, assim, não ocorram problemas com a reprodutibilidade do sinal. Deste modo, analisando o espectro de massas no modo SCAN de cada substância após a reação de derivatização, foi determinado quais seriam os íons empregados para a quantificação e confirmação.

Alguns compostos não necessitam da reação de derivatização, assim sua massa molar não sofre alteração, como é o caso da atrazina, atrazina-D₅, cafeína e progesterona. Optou-se por utilizar um íon para a quantificação e dois íons para a confirmação de cada substância, sendo possível observá-los na Tabela 5. Para o 4-octilfenol e 4-nonilfenol, assim como para atrazina e triclosan, foi selecionado o mesmo íon de quantificação. No entanto, isso é viável apenas quando as substâncias não coeluem. No caso de ocorrer a coeluição seria impossível distinguir a partir de qual substância o íon de quantificação estaria sendo gerado.

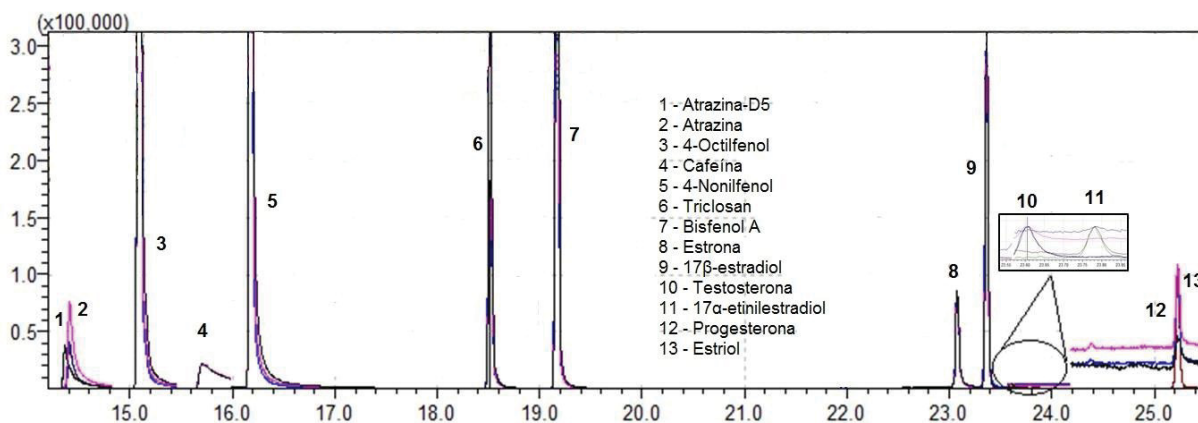
TABELA 5. MASSA MOLAR APÓS A DERIVATIZAÇÃO E ÍONS DE RAZÃO M/Z ESCOLHIDOS PARA A QUANTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DAS 13 SUBSTÂNCIAS NO MODO SIM.

Substância	Massa molar (g mol ⁻¹)	Massa molar após a derivatização (g mol ⁻¹)	Íon de quantificação (m/z)	Íon de confirmação (m/z) (1)	Íon de confirmação (m/z) (2)
Atrazina-D ₅	220,71	220,71	205	220	178
Atrazina	215,68	215,68	200	215	173
Bisfenol A	228,00	372	357	358	359
Cafeína	194,19	194	194	109	193
4-Octilfenol	206,00	278	179	180	278
4-Nonilfenol	220,35	292	179	180	292
Triclosan	289,54	361	200	347	345
Estrona	270,37	342	342	257	218
17β-Estradiol	272,38	416	285	416	129
Testosterona	288,42	360	129	91	226
17α-Etinilestradiol	296,40	440	285	368	342
Progesterona	314,46	314,46	124	91	105
Estriol	288,38	504	311	296	297

FONTE: O autor (2017).

O cromatograma obtido no modo SIM de uma solução mix de 1,00 mg L⁻¹ pode ser visualizado na Figura 4. O cromatograma típico para este modo apresenta picos com intensidade referentes a quantidade detectada dos íons selecionados para a quantificação e confirmação. Através de recursos disponibilizados pelo software, é possível selecionar os picos dos íons de quantificação para cada composto separadamente e, assim, determinar a sua área de pico para uma eventual quantificação.

FIGURA 4. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA OBTIDA NO MODO SIM POR GC-MS/MS PARA UMA SOLUÇÃO MIX DE 13 CONTAMINANTES EMERGENTES NA CONCENTRAÇÃO DE 1,00 MG L⁻¹ APÓS A REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.



FONTE: O autor (2017).

Foi observada uma maior intensidade dos picos para o 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan, bisfenol A e 17β-estradiol. No entanto, para outras substâncias, como no caso da cafeína, progesterona e estriol, a intensidade do sinal foi menor. Essa diferença de intensidade para as substâncias é esperada, uma vez que o detector pode fornecer diferentes respostas para cada substância, devido a quantidade de íons formados no processo de ionização, que é dependente da energia de ionização empregada.

A energia de ionização usualmente utilizada é de 70 eV, pois neste valor a probabilidade de ionização para grande parte das substâncias é maximizada (BUSTILLOS, SASSINE e MARCH, 2003). Também, os padrões de fragmentação obtidos nesta energia podem ser comparados com milhares de espectros de massas de referência que também foram adquiridos a 70 eV (WATSON e SPARKMAN, 2007). Contudo, para certos compostos essa quantidade de energia pode causar uma fragmentação extensiva, podendo resultar na ausência ou intensidade pouco significativa do íon molecular no espectro (DASS, 2007).

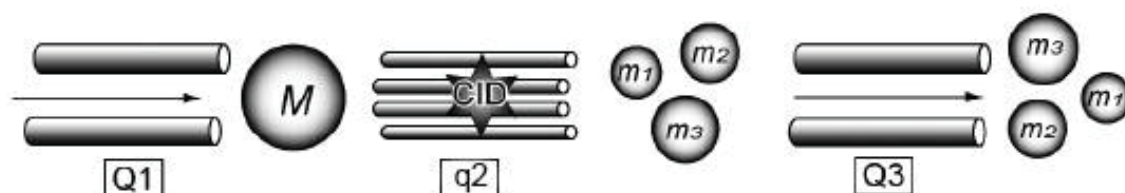
4.2 OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO E OBTENÇÃO DO MÉTODO MRM

Esta otimização foi realizada com o intuito de estabelecer as melhores energias de colisão que fornecessem um sinal referente a transição do sistema íon

precursor > íon produto de maior intensidade e, conseqüentemente, resultasse numa melhor seletividade e detectabilidade dos compostos. Para isto, foi feita inicialmente a análise de uma solução mix de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ no modo SCAN utilizando as condições cromatográficas já mencionadas anteriormente. A partir do espectro de massas obtido para cada substância foram escolhidos os íons precursores, ou seja, aqueles íons de razão m/z que possuíam maior intensidade. Os íons precursores escolhidos para cada substância foram os mesmos íons selecionados como íons de quantificação no modo SIM, pois estes foram os que apresentaram sinais com maior intensidade.

Uma vez estabelecido quais seriam os íons precursores, o espectrômetro de massas foi configurado no modo de *Product Ion Scan* (Figura 5), que consiste na seleção de um íon precursor de valor m/z em Q1 e que em seguida sofre fragmentação na célula de colisão (q2) devido a colisão com moléculas de argônio sob a aplicação de um potencial. Então, todos os íons formados após a colisão (íons produtos) são monitorados em Q3 (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Deste modo, é possível determinar quais seriam as transições íon precursor > íon produto de maior intensidade relativa e em qual energia de colisão isso ocorreria.

FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DOS ANALISADORES DE MASSA DO TIPO TRIPLO QUADRUPOLO OPERANDO NO MODO PRODUCT ION SCAN.



FONTE: Adaptada de SHIMADZU (2014).

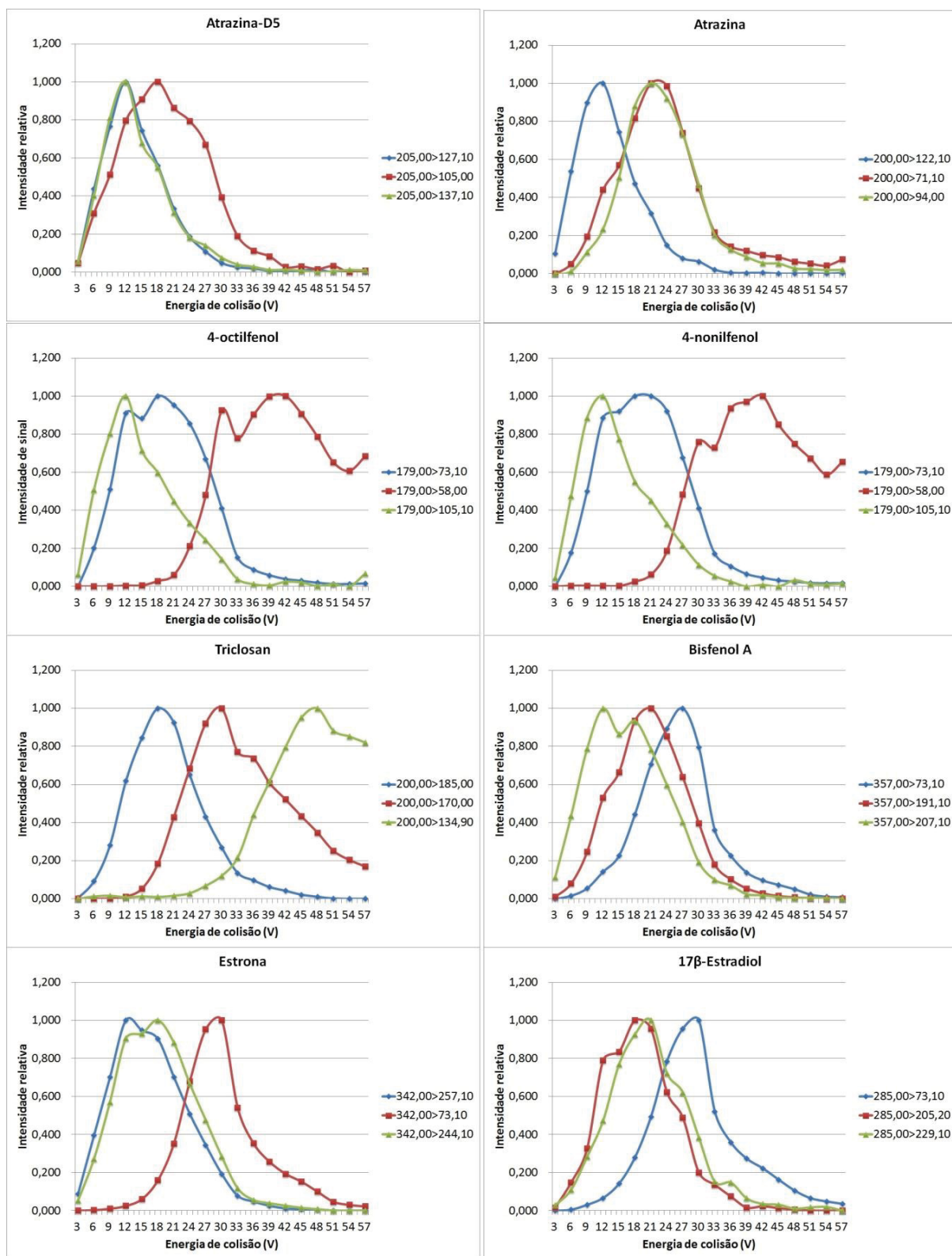
LEGENDA: M é o íon precursor e m1, m2 e m3 são os íons produto.

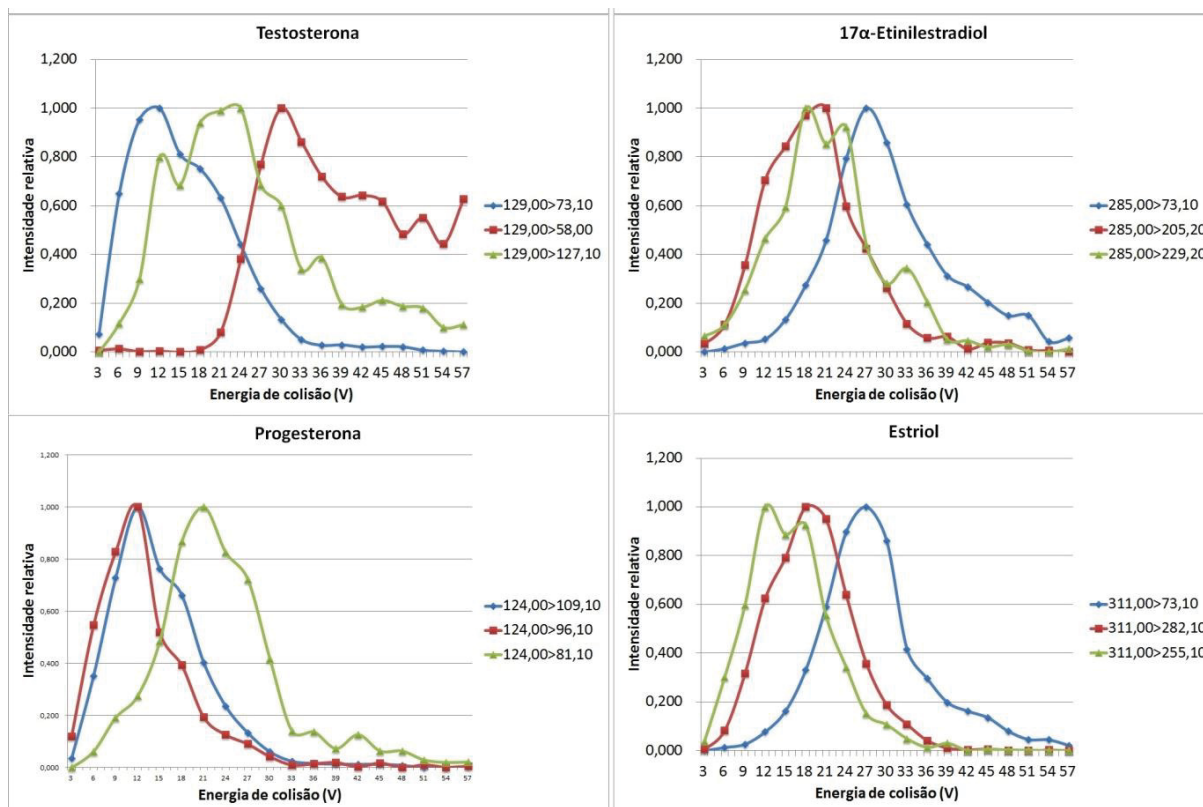
CID - *Collision-Induced dissociation*.

Decidiu-se trabalhar com as três transições íon precursor > íon produto que proporcionassem as maiores intensidades relativas, sendo que a de melhor resposta seria utilizada para a quantificação e as outras duas para a confirmação das substâncias. A faixa de energia de colisão empregada em q2 variou de 3 a 57 V com um intervalo de 3 V. A Figura 6 apresenta, para cada substância estudada, gráficos que representam o processo de otimização das energias de colisão. Os gráficos

mostram as intensidades relativas versus a energia de colisão para cada substância nas três transições íon precursor > íon produto de melhor resposta.

FIGURA 6. GRAFICOS DA OTIMIZAÇÃO DAS ENERGIAS DE COLISÃO PARA AS TRANSIÇÕES ÍON PRECURSOR > ÍON PRODUTO PARA OS CONTAMINANTES EMERGENTES.





FONTE: O autor (2017).

O aspecto de uma distribuição gaussiana do gráfico ocorre, provavelmente, porque em energias menores não há uma fragmentação suficiente do íon precursor que resulte em uma grande quantidade de íons produto. Ao aumentar a energia, a intensidade também vai aumentando até um valor ótimo de energia de colisão. Contudo, ao aumentar ainda mais a energia, a intensidade é diminuída, pois a alta energia empregada provoca uma maior fragmentação do íon precursor, o que resulta em diversos outros íons produto de menor intensidade relativa. Assim, com base no resultado da otimização das energias de colisão, foi possível a criação do método MRM baseado nas condições apresentadas na Tabela 6.

É importante ressaltar a ausência da otimização das energias de colisão para as transições íon precursor > íon produto para a cafeína. Isso se deu pois no momento da análise no modo SCAN não foi encontrado o pico para essa substância. Deste modo, como a otimização baseia-se nos espectros de massa obtidos na análise SCAN não foi possível realizar esse processo para a cafeína. A ausência do pico da cafeína pode ser devido a uma possível degradação desta substância com o decorrer do tempo, uma vez que a solução mix utilizada nesta análise foi preparada

a partir de soluções estoque preparadas há alguns meses anteriores e que passaram por eventual exposição à luz.

TABELA 6. TRANSIÇÕES ÍON PRECURSOR > ÍON PRODUTO E SUAS ENERGIAS DE COLISÃO (EC) OTIMIZADAS PARA A CRIAÇÃO DO MÉTODO MRM PARA OS 12 CONTAMINANTES EMERGENTES.

Substância	Íon precursor (m/z)	Quantificação		Confirmação (1)		Confirmação (2)	
		Transição (m/z)	EC (V)	Transição (m/z)	EC (V)	Transição (m/v)	EC (V)
Atrazina-D ₅	205	205,00 > 127,10	12	205,00 > 105,00	18	205,00 > 137,10	12
Atrazina	200	200,00 > 122,10	12	200,00 > 71,10	21	200,00 > 94,00	21
Bisfenol A	357	357,00 > 73,10	27	357,00 > 191,10	21	357,00 > 207,10	12
4-Octilfenol	179	179,00 > 73,10	18	179,00 > 58,00	42	179,00 > 105,10	12
4-Nonilfenol	179	179,00 > 73,10	21	179,00 > 58,00	42	179,00 > 105,10	12
Triclosan	200	200,00 > 185,00	18	200,00 > 170,00	30	200,00 > 134,90	48
Estrona	342	342,00 > 257,10	12	342,00 > 73,10	30	342,00 > 244,10	18
17β-Estradiol	285	285,00 > 73,10	30	285,00 > 205,20	18	285,00 > 229,10	21
Testosterona	129	129,00 > 73,10	12	129,00 > 58,00	30	129,00 > 127,10	24
17α-Etinilestradiol	285	285,00 > 73,10	27	285,00 > 205,20	21	285,00 > 229,20	18
Progesterona	124	124,00 > 109,10	12	124,00 > 96,10	12	124,00 > 81,10	21
Estriol	311	311,00 > 73,10	27	311,00 > 282,10	18	311,00 > 255,10	12

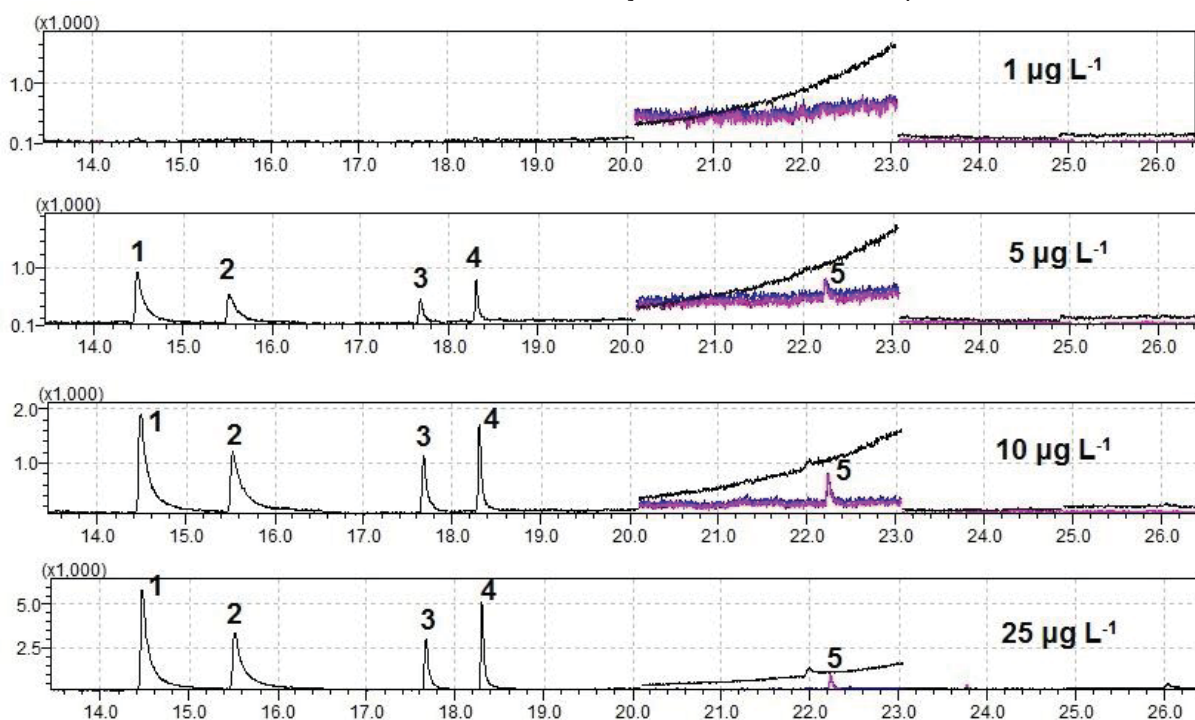
FONTE: O autor (2017).

Quando o espectrômetro é configurado no modo de aquisição de dados SIM, apenas uma porcentagem dos íons chega ao detector, deste modo há uma melhor diferenciação do sinal do analito frente ao sinal de interferentes (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). No modo MRM o sistema é muito menos afetado pela presença de interferentes quando comparado com o modo SIM, pois apenas íons produtos de razão m/z provenientes de determinados íons precursores chegarão ao detector. Assim, estas características do modo MRM proporcionam análises quantitativas com maior seletividade e detectabilidade.

Tendo em vista que as substâncias aqui estudadas são encontradas em concentrações baixas, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , em diferentes matrizes aquosas como águas naturais e águas residuais urbanas (BOLONG *et al.*, 2009), a presença de interferentes poderiam dificultar a determinação dessas substâncias e, assim, a aquisição dos dados no modo MRM se faz mais adequada para o presente trabalho.

Deste modo, a fim de avaliar a detectabilidade dos contaminantes emergentes pelo modo MRM, foram analisadas soluções mix de 1, 5, 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ empregando o método MRM criado a partir da otimização das energias de colisão. Os cromatogramas obtidos para estas análises podem ser visualizados na Figura 7.

FIGURA 7. CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO MODO MRM PARA AS SOLUÇÕES MIX DOS 12 CONTAMINANTES NAS CONCENTRAÇÕES DE 1, 5, 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: (1) 4-Octilfenol, (2) 4-Nonilfenol, (3) Triclosan, (4) Bisfenol A e (5) 17 β -Estradiol.

Para a concentração de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos 12 contaminantes emergentes não foi observado a presença de pico algum. Já a partir da concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi observado a presença de cinco picos, sendo eles em ordem de eluição: 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan, bisfenol A e 17 β -estradiol. Contudo, na concentração de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ o sinal do 17 β -Estradiol não estava distinguível do ruído químico.

A sensibilidade e limite de detecção de um espectrômetro de massas sequencial não estão mais limitados pelo ruído do detector, mas sim pelo ruído químico, um sinal gerado no espectro de massas devido a produção de íons de outros componentes da amostra, interferentes presentes no sistema de introdução de amostra ou na fonte de íons do espectrômetro de massas (JOHNSON e YOST, 1985).

Fica evidenciado nesse teste que as substâncias pertencentes a classe dos metabólitos de detergente (4-octilfenol e 4-nonilfenol), antimicrobianos (triclosan) e plastificante (bisfenol A) apresentaram maior detectabilidade na menor concentração possível ($5,00 \mu\text{g L}^{-1}$) quando o modo MRM foi empregado. Deste modo, decidiu-se continuar o desenvolvimento deste projeto focando na determinação desses quatro contaminantes emergentes em matrizes aquosas.

4.3 CURVAS ANALÍTICAS

A partir do resultado dos testes de detectabilidade dos contaminantes emergentes por GC-MS/MS empregando o modo de aquisição de dados MRM, optou-se por utilizar o bisfenol A-D₁₆ como padrão interno na construção das curvas analíticas por ser a substância com características químicas mais próximas de pelo menos um dos analitos e, também, pela disponibilidade deste padrão no laboratório.

Assim, foi feita a otimização das energias de colisão para o bisfenol A-D₁₆ seguindo o mesmo procedimento realizado para as demais substâncias como descrito no item 4.2, contudo, utilizando uma solução mix de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ contendo apenas os compostos que apresentaram maior detectabilidade (4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan, bisfenol A) e o padrão interno bisfenol A-D₁₆.

O resultado da otimização das energias de colisão para as transições íon precursor > íon produto das quatro substâncias foi o mesmo que o obtido anteriormente (Tabela 6). A Tabela 7 apresenta os valores dos parâmetros otimizados para o bisfenol A-D₁₆.

TABELA 7. TRANSIÇÕES ÍON PRECURSOR > ÍON PRODUTO E SUAS ENERGIAS DE COLISÃO (EC) OTIMIZADAS PARA O PADRÃO INTERNO BISFENOL A-D₁₆.

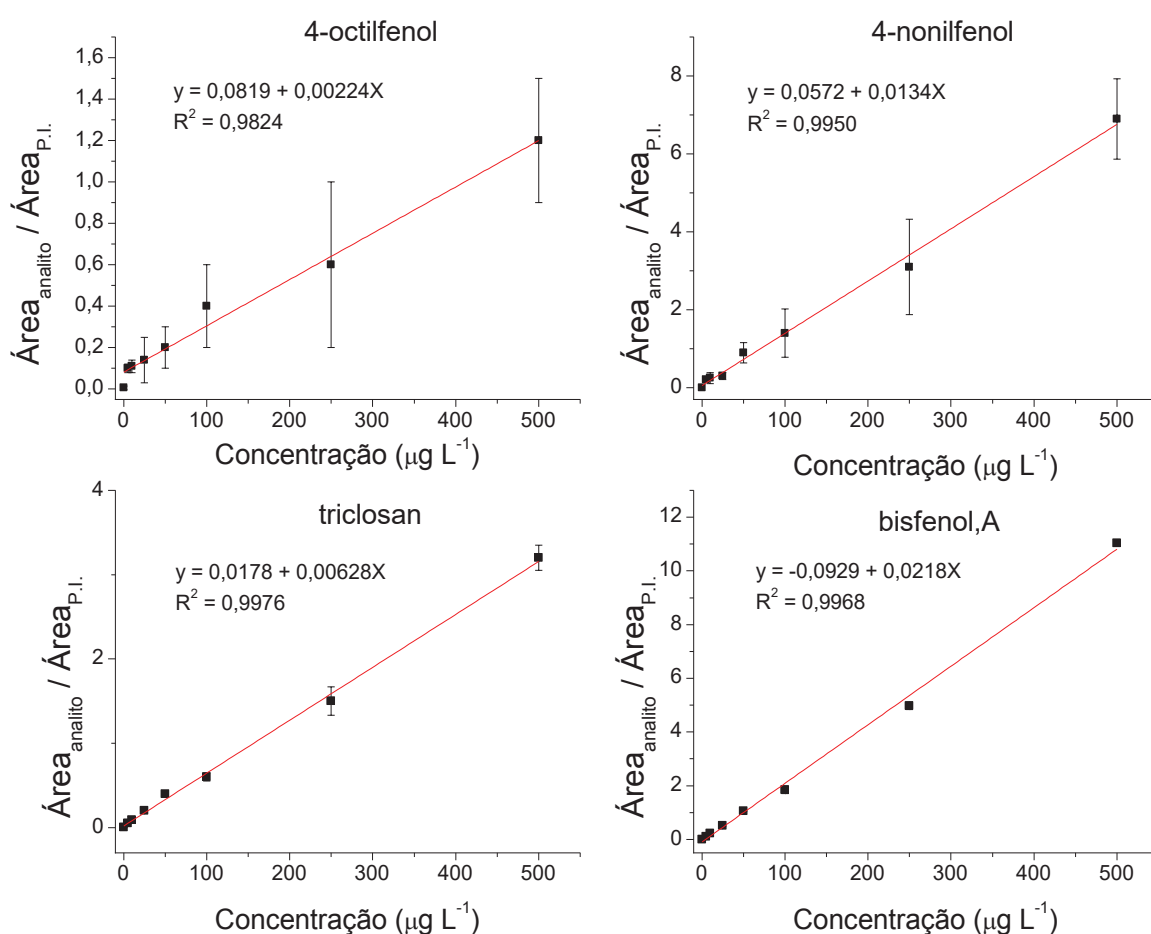
Substância	Íon precursor (m/z)	Quantificação		Confirmação (1)		Confirmação (2)	
		Transição	EC (V)	Transição	EC (V)	Transição	EC (V)
bisfenol A-D ₁₆	368	368,00 > 73,10	24	368,00 > 197,10	24	368,00 > 296,10	27

FONTE: O autor (2017).

A quantificação das substâncias foi realizada por meio da construção da curva analítica para cada analito, correlacionando a razão área de pico do analito pela área de pico do padrão interno e a concentração do analito na faixa de trabalho

escolhida (5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$). O padrão interno é utilizado com o objetivo de minimizar os desvios nas respostas e melhorar a quantificação dos compostos através da compensação da variação do sistema cromatográfico (MACHADO *et al.*, 2017). As curvas analíticas com as regressões lineares e os coeficientes de determinação (R^2) para as quatro substâncias podem ser visualizadas na Figura 8.

FIGURA 8. CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA AS SUBSTÂNCIAS 4-OCTILFENOL, 4-NONILFENOL, TRICLOSAN E BISFENOL A EMPREGANDO O MODO DE AQUISIÇÃO DE DADOS MRM POR GC-MS/MS (n = 4).



FONTE: O autor(2017).

Idealmente, o padrão interno deve ser uma substância similar a substância que será determinada, não fazer parte da amostra e possuir tempo de retenção próximo a da substância, mas, não coeluir com os demais compostos da amostra (SKOOG, 2006). Vale ressaltar que os compostos 4-octilfenol e 4-nonilfenol não possuem uma grande similaridade, em termos de estrutura química, com o bisfenol

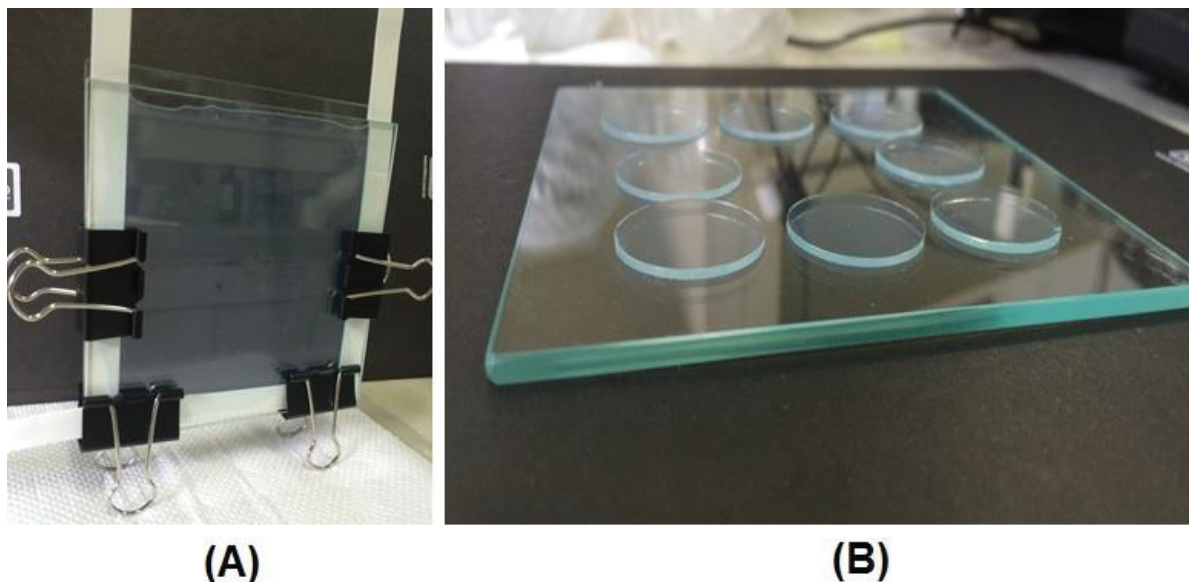
A-D₁₆, o que pode ter influenciado na estimativa do desvio padrão obtido para cada ponto da curva. Embora o 4-octilfenol e o 4-nonilfenol tenham apresentado um maior desvio padrão entre as réplicas, todos os compostos apresentaram uma boa linearidade com $R^2 > 0,98$.

4.4 PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE E IMOBILIZAÇÃO DA C₁₈ E DA RESINA OASIS HLB

Com base em trabalhos descritos na literatura (COLAÇO *et al.*, 2012; CHEN, ZHANG e JONES, 2012; CHEN *et al.*, 2013), decidiu-se trabalhar com o gel de agarose 1,5% (m/v) em uma espessura de 0,8 mm como gel difusivo no o-DGT. A dificuldade inicial da preparação do gel foi a solubilização completa da agarose em água. Nos testes iniciais foi utilizada uma chapa de aquecimento para aquecer a solução até 80 °C, contudo havia uma grande dispersão do calor, o que fazia com que a temperatura mostrada no visor não fosse a real temperatura dentro da solução. Com isso, um termômetro digital foi utilizado para medir a temperatura dentro da solução, possibilitando uma melhor solubilização da agarose na temperatura correta.

Preparada a solução do gel de agarose, esta foi vertida entre as duas placas de vidro pré-aquecidas contendo espaçadores de 0,8 mm (Figura 9A) e levada à cabine de fluxo laminar. É inevitável a presença de algumas bolhas de ar no gel formado após a geleificação, deste modo, é preciso evitar a presença dessas bolhas nos discos seccionados, pois isso poderia influenciar nos coeficientes de difusão dos contaminantes emergentes quando utilizado como gel difusivo no amostrador o-DGT. Os discos de gel de agarose seccionados podem ser visualizados na Figura 9B.

FIGURA 9. (A) APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DO GEL DE AGAROSE CONSTITUÍDO DE DUAS PLACAS DE VIDRO, SENDO UMA COM DIMENSÃO DE 11 CM x 11 CM E OUTRA COM 11 CM x 10,5 CM, COM ESPAÇADORES DE 0,8 MM; (B) DISCOS DE GEL DE AGAROSE COM DIÂMETRO DE 2,5 CM.



FONTE: O autor (2017).

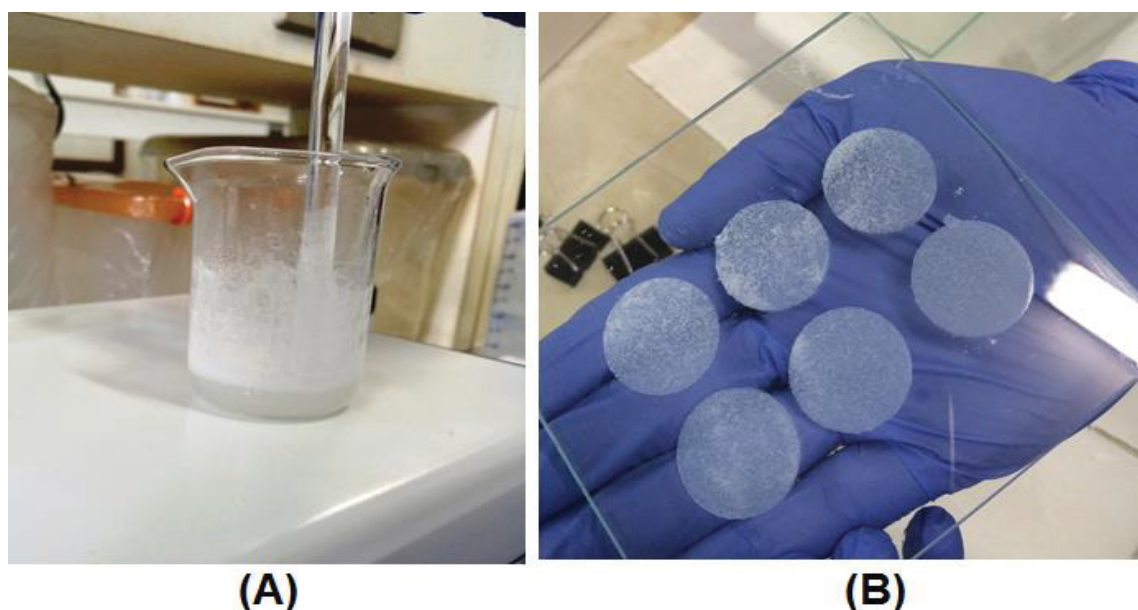
Estudos envolvendo a interação da C_{18} com interferentes endócrinos podem ser encontrados na literatura e, mais recentemente, Ganan *et al.* (2015) investigaram a capacidade de adsorção de uma sílica funcionalizada com grupos octadecil (C_{18}) frente a uma mistura de doze interferentes endócrinos da classe dos hormônios (sintéticos e naturais) em água. O método de extração otimizado apresentou boas precisão, exatidão e linearidade, com limites de quantificação entre 0,16 e 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. A C_{18} possibilitou a extração dos doze hormônios em água de torneira, água mineral, água de rio e efluentes, com recuperação entre 70 e 112%.

Com isto, seria interessante a utilização da C_{18} como fase ligante nos dispositivos o-DGT, de modo a estudar a capacidade de adsorção não somente para hormônios, mas também para outros contaminantes emergentes pertencentes a diferentes classes. Para isso, se fez necessário a etapa de imobilização da C_{18} no gel de agarose.

No entanto, a solução contendo o gel de agarose e a C_{18} apresentou inicialmente duas fases, sendo a fase superior a C_{18} , conforme apresentado na Figura 10A, o que dificultou a pipetagem entre as placas de vidro. Ainda, não houve uma boa dispersão da C_{18} no gel, resultando em discos com diferentes quantidades de C_{18} , como mostrado na Figura 10B. Devido, provavelmente, ao caráter

hidrofóbico deste material, não houve uma interação efetiva com o gel de agarose, pois este é formado majoritariamente por água, o que poderia ocasionar problemas de reprodutibilidade na confecção dos discos. Assim, optou-se por não utilizar os discos de gel de agarose contendo C_{18} como possível fase ligante no amostrador o-DGT.

FIGURA 10. SOLUÇÃO CONTENDO O GEL DE AGAROSE E C_{18} ; (B) DISCOS DE C_{18} IMOBILIZADA NO GEL DE AGAROSE COM DIÂMETRO DE 2,5 CM.

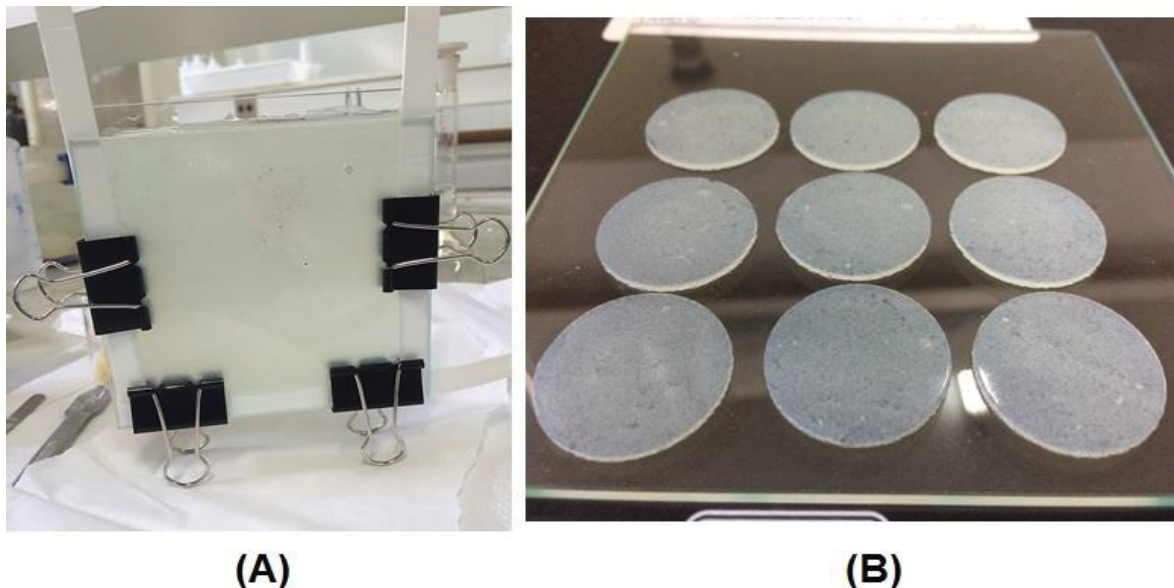


FONTE: O autor (2017).

A extração de contaminantes emergentes utilizando cartuchos SPE Oasis HLB da Waters® foi realizada em trabalho recente desenvolvido no nosso grupo de pesquisa. No referido estudo, Machado (2015) desenvolveu um protocolo analítico para determinação de contaminantes emergentes pertencentes a diferentes classes em água tratada empregando GC-MS. A avaliação da eficiência do processo de extração do método foi realizada a partir dos ensaios de recuperação, os quais apresentaram resultados satisfatórios para a maioria dos compostos avaliados.

Com base nestes resultados e na disponibilidade de cartuchos SPE Oasis HLB, foi decidido utilizar esta fase sorvente imobilizada no gel de agarose como uma possível fase ligante do o-DGT. O aparato experimental contendo a solução de HLB e gel de agarose, bem como os discos obtidos, podem ser visualizados na Figura 11A e 11B, respectivamente.

FIGURA 11. (A) APARATO EXPERIMENTAL CONTENDO A SOLUÇÃO DE GEL DE AGAROSE E HLB ENTRE DUAS PLACAS DE VIDRO, SENDO UMA COM DIMENSÃO DE 11 CM x 11 CM E A OUTRA COM 11 CM x 10,5 CM, COM ESPAÇADORES DE 0,5 MM; (B) DISCOS DE HLB IMOBILIZADA NO GEL DE AGAROSE COM DIÂMETRO DE 2,5 CM.



FONTE: O autor (2017).

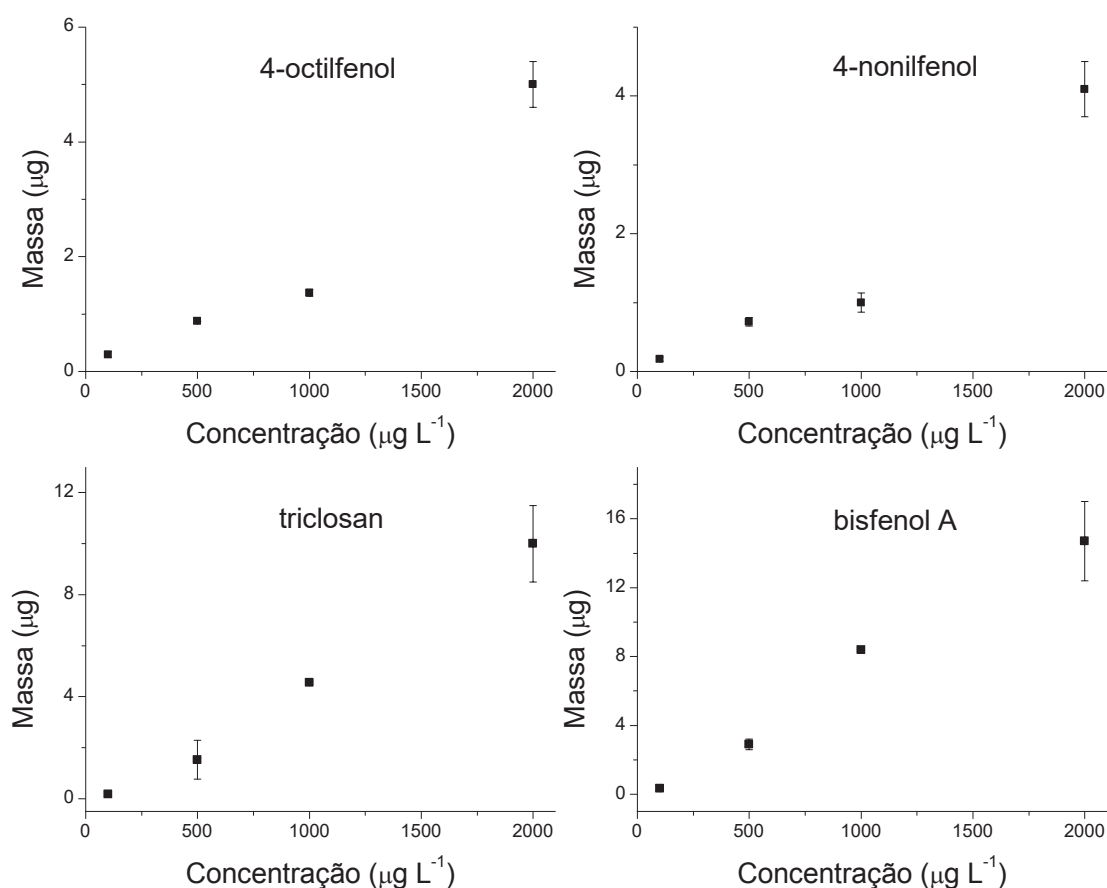
A HLB é um sorvente misto, ou seja, é constituído por um polímero lipofílico (divinilbenzeno) combinado com um polímero hidrofílico (n-vinilpirrolidina) e, deste modo, apresentou melhor dispersão no gel do que a C_{18} e a pipetagem da solução entre as placas de vidro foi melhor sucedida. Tendo em vista estes aspectos, nos testes de sorção e dessorção com os contaminantes emergentes que apresentaram melhor detectabilidade no GC-MS/MS foram empregados os discos de HLB imobilizada no gel de agarose.

4.5 ESTUDO DA CAPACIDADE DE SORÇÃO DA RESINA OASIS HLB IMOBILIZADA NO GEL DE AGAROSE

Na realização deste teste foi levado em consideração a solubilidade dos compostos em água. Como o triclosan apresenta a menor solubilidade entre as espécies de interesse, sendo $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ a 30°C (GROVE *et al.*, 2003), esta foi a concentração máxima da solução mix dos compostos. A solubilidade do 4-octilfenol e do 4-nonilfenol na temperatura de $20,5^\circ\text{C}$ é de $12,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $5,4 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (AHEL e GIGER, 1993). Por fim, a 25°C o bisfenol A possui uma solubilidade de 200 mg L^{-1} (POERSCHMANN, TROMMLER e GÓRECKI, 2010).

Na Figura 12 é possível observar que a massa sorvida aumentou com a concentração dos mesmos em solução aquosa até a concentração de $2000 \mu\text{g L}^{-1}$, indicando que não houve a saturação do disco contendo HLB. Como os contaminantes emergentes são encontrados em matrizes aquosas em níveis de concentração muito baixos na ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$ (JIANG, ZHOU e SHARMA, 2013), recomenda-se aplicar os amostradores o-DGT durante períodos de tempo maiores (CHEN *et al.*, 2013) para que se possa obter uma maior massa sorvida dessas substâncias e, assim, sejam passíveis de detecção e quantificação.

FIGURA 12. MASSA EXTRAÍDA DOS DISCOS DE HLB EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS EM $\text{pH } 5,8 \pm 0,1$ E FORÇA IÔNICA DE $0,01 \text{ MOL L}^{-1}$ ($n=4$).



FONTE: O autor (2017).

Como estes compostos se encontram em concentrações muito menores em ambientes aquáticos do que as utilizadas neste experimento, é sensato considerar que o emprego do disco de HLB como fase ligante no amostrador o-DGT se mostraria eficaz, não apresentando o risco de saturação desta fase mesmo em

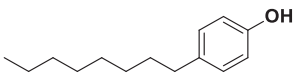
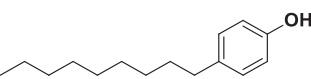
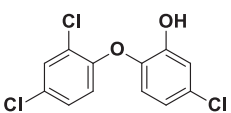
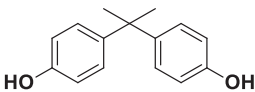
longos períodos de amostragem. Ainda, levando em consideração a massa de HLB por disco, cerca de 25 mg, pôde-se comprovar a alta capacidade de sorção dessa fase ligante nas condições de pH e força iônica empregadas.

4.6 ESTUDOS DE DESSORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS NO DISCO DE HLB

4.6.1 Escolha do solvente, número de eluições e tempo de dessorção no banho ultrassônico

É importante que a fase ligante empregada no amostrador o-DGT apresente uma alta capacidade de sorção dos analitos e também uma ótima dessorção dessas substâncias. Como as substâncias sorvidas nos discos de HLB pertencem a diferentes classes de contaminantes emergentes e, deste modo, apresentam diferentes propriedades físico-químicas (Tabela 8), seria interessante encontrar o solvente que apresentasse uma boa interação com os compostos de modo a melhorar a dessorção deles do disco.

TABELA 8. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURA QUÍMICA DOS CONTAMINANTES EMERGENTES.

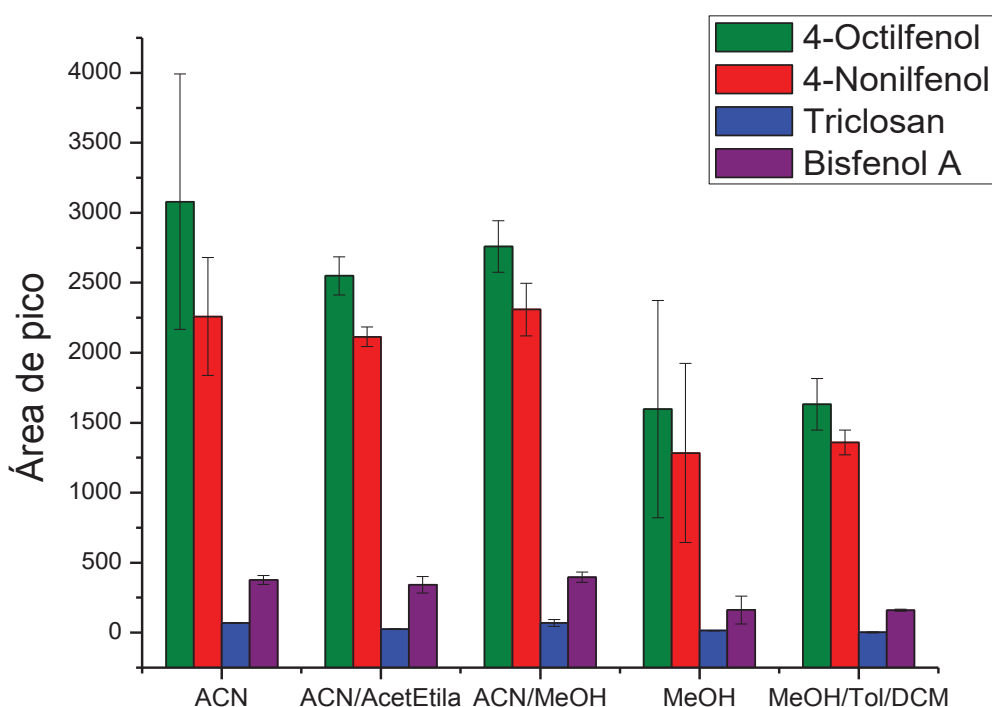
Substância	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Log Kow	pKa	Estrutura química
4-octilfenol	206,00	5,56 ^a	10,4 ^d	
4-nonilfenol	220,35	5,76 ^a	10,7 ^e	
Triclosan	289,54	4,76 ^b	8,1 ^f	
Bisfenol A	228,00	3,32 ^c	9,6 - 10,2 ^g	

FONTE: (a) SALGUEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2013; (b) MONTASERI e FORBES, 2016; (c) STAPLES *et al.*, 1998; (d) BLEDZKA, GRYGLIK e MILLER, 2009; (e) Mao *et al.*, 2012; (f) TIXIER *et al.*, 2002; (g) KOSKY e GUGGENHEIM, 1991.

LEGENDA: Log Kow - logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

Assim, com intuito de encontrar um solvente que apresentasse maior interação com os compostos, foram testados solventes e mistura de solventes relatados na literatura que vem sendo empregados na extração de contaminantes emergentes em diversas fases sorventes (ZENOBIO *et al.*, 2015; ALVAREZ *et al.*, 2004; AMDANY, CHIMUKA e CUKROWSKA, 2014; MACHADO *et al.*, 2016). A Figura 13 apresenta os valores médios de área de pico para cada substância desorvida do disco de HLB quando utilizado diferentes solventes.

FIGURA 13. VALORES MÉDIOS DE ÁREA DE PICO DE CADA SUBSTÂNCIA DESSORVIDA DO DISCO DE HLB EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES (n=3).



FONTE: O autor (2017).

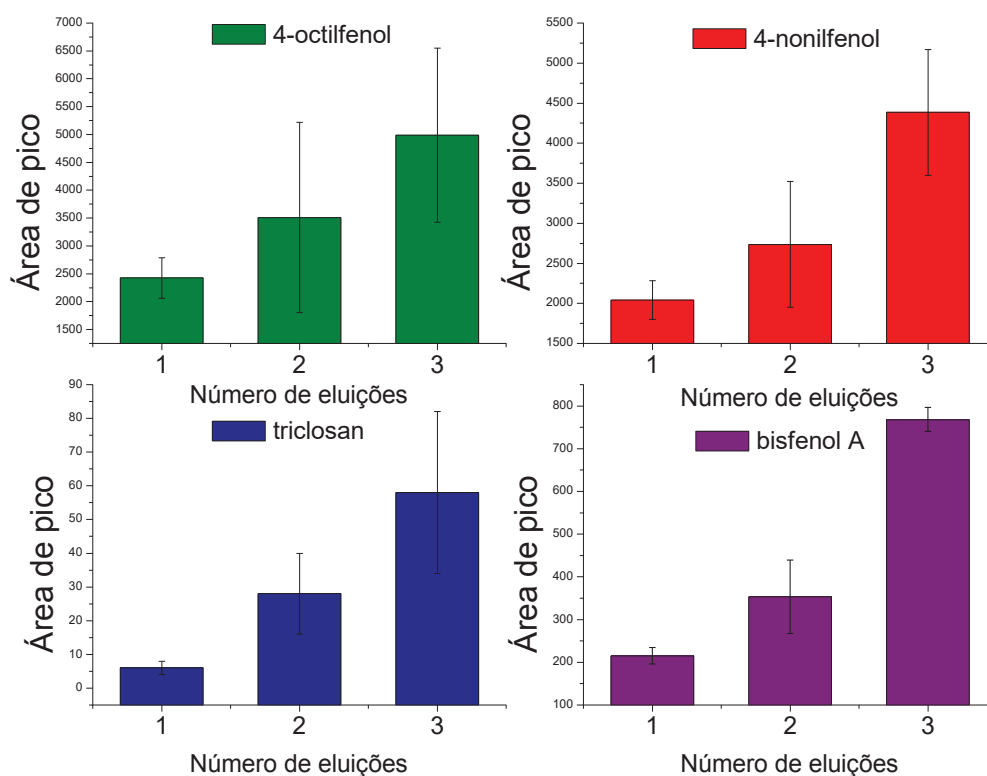
LEGENDA: acetonitrila (ACN), acetonitrila/acetato de etila (1:1, v/v) (ACN/AcetEtila), metanol (MeOH), acetonitrila/metanol (2:1, v/v) (ACN/MeOH) e metanol/tolueno/diclorometano (1:1:8, v/v/v) (MeOH/Tol/DCM).

A mistura dos solventes acetonitrila/metanol (2:1, v/v) foi o eluente que forneceu maiores médias de áreas de pico para os compostos e menores estimativas de desvio padrão. O emprego do solvente acetonitrila resultou numa maior média de área de pico para o 4-octilfenol, contudo apresentou uma estimativa do desvio padrão mais elevada, indicando uma menor precisão entre os valores das

triplicatas. Ainda, a acetonitrila apresenta um ponto de ebulição de 81,65 °C, sendo mais elevado que a temperatura de 64,6 °C do metanol (LIDE, 2005), o que acarretaria em um maior tempo necessário para a sua volatilização antes da realização da etapa de derivatização dos compostos. Deste modo, frente às substâncias estudadas, optou-se por utilizar como solvente a mistura acetonitrila/metanol.

Após a definição do solvente que proporcionasse uma melhor dessorção dos analitos do disco de HLB, foi estudado o número de eluições e o tempo de dessorção das substâncias retidas no disco de HLB empregando o banho ultrassônico. O resultado para o estudo de número de eluições e o tempo de sonicação pode ser visualizado nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

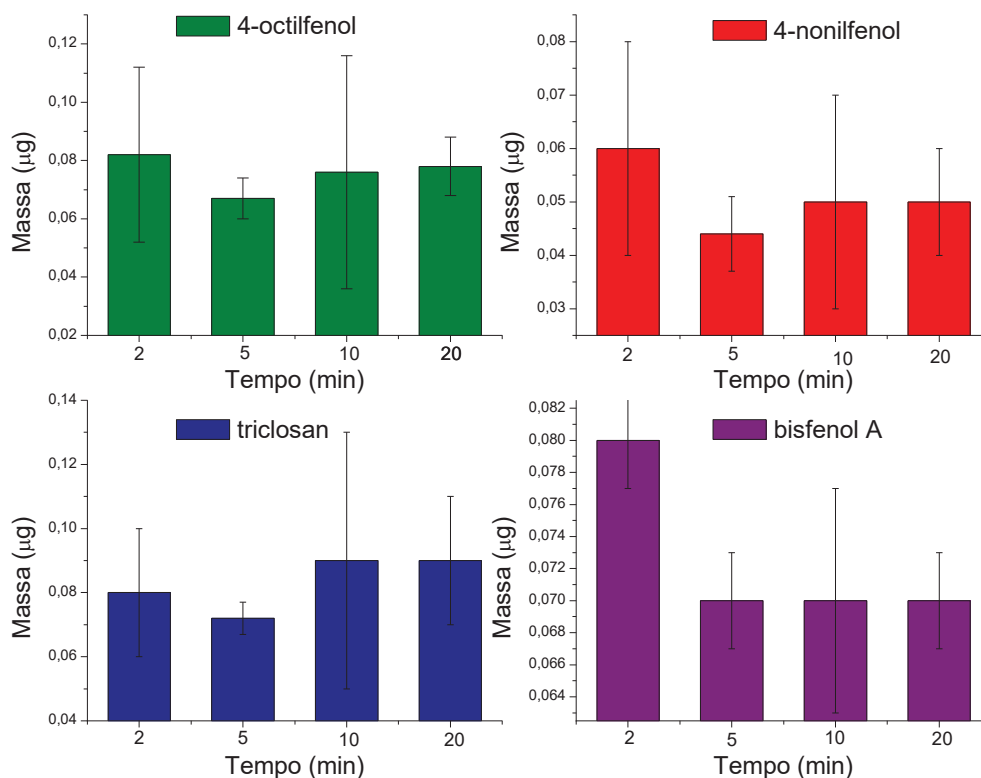
FIGURA 14. VALORES MÉDIOS DAS ÁREAS DE PICO DE CADA SUBSTÂNCIA DESSORVIDA DO DISCO DE HLB EMPREGANDO DIFERENTES NÚMEROS DE ELUIÇÕES COM 3,0 ML DE SOLVENTE ACETONITRILA/METANOL (2:1, V/V) (n=3).



FONTE: O autor (2017).

Observa-se que com o aumento do número de eluições a área de pico média dos compostos aumenta significativamente, indicando uma maior dessorção das substâncias. É importante ressaltar que os valores de log Kow dessas substâncias (Tabela 8) sugerem uma maior afinidade delas pela fase orgânica, além de ser conhecido que é melhor utilizar várias frações menores de solvente para extrair o analito entre duas fases do que uma única fração de volume maior (SKOOG *et al.*, 2014). No entanto, em termos operacionais, aumentando ainda mais o número de eluição resultaria num volume final do solvente também maior, demandando um tempo maior na etapa de evaporação do mesmo para, então, ser realizada a derivatização das substâncias. Também, o volume máximo dos tubos do concentrador a vácuo é de 10 mL, o que inviabiliza a evaporação de volumes maiores. Deste modo, optou-se por utilizar três eluições com 3 mL do solvente nos experimentos posteriores.

FIGURA 15. VALORES MÉDIOS DAS MASSAS DAS SUBSTÂNCIAS DESSORVIDAS UTILIZANDO DIFERENTES TEMPOS DE SONICAÇÃO (n=3).



FONTE: O autor (2017).

Empregando dois minutos de sonicação nos discos de HLB foi observado uma maior média de massa dessorvida para a maioria das substâncias. A partir do tempo de dez minutos foi observado a desintegração de alguns discos durante o emprego da sonicação, o que resultou na presença de HLB no tubo de ensaio contendo o solvente eluente após a dessorção. Até o momento da filtração no filtro seringa, os analitos podem ter sido sorvidos novamente pela HLB, resultando em menores quantidades de massa extraída e, também, esse evento pode ter influenciado nos valores significativos de desvios padrão para esses tempos. Por estes motivos e por propiciar uma diminuição significativa do tempo do processo de dessorção, dois minutos de sonicação foi escolhido como o tempo padrão na etapa de dessorção.

Com isso, foi feita uma estimativa do fator de eluição (f_e) das substâncias no disco de HLB. Este fator está relacionado à eficiência da etapa de eluição e recuperação dos compostos sorvidos, sendo que é dependente da substância, e se faz importante para evitar uma subestimativa ou superestimativa da concentração determinada após a amostragem com o o-DGT. Considerando uma sorção de 100% dos analitos no disco e realizando a dessorção com três eluições com acetonitrila/metanol (2:1, v/v) e dois minutos no banho ultrassônico entre cada eluição, foram obtidos f_e de 0,66; 0,44; 0,47 e 0,70 para o 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A, respectivamente. Isso significa que, por exemplo para o 4-octilfenol, a eficiência do processo de eluição do composto sorvido na fase ligante é de 66%.

4.7 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO APARENTE DOS CONTAMINANTES EMERGENTES EM GEL DE AGAROSE

Os primeiros trabalhos envolvendo a determinação de substâncias orgânicas empregando o amostrador o-DGT utilizaram a fase sortiva XAD18 imobilizada no gel de agarose como fase ligante e o gel de agarose juntamente com a membrana de polietersulfona (PES) como camada difusiva (Chen, Zhang e Jones, 2012; Chen *et al.*, 2013).

Mais recentemente, Challis, Hanson e Wong (2016) propuseram uma nova configuração de amostradores o-DGT constituída apenas da fase ligante (HLB imobilizada no gel de agarose) e o gel de difusão (gel de agarose), sem a utilização

da membrana de filtração de PES. Esta nova configuração surgiu após testes comprovarem que a membrana era capaz de sorver significativamente grande parte das substâncias em estudo pertencentes a classe de fármacos e pesticidas. Compostos que possuem um caráter moderadamente polar (valores maiores de K_{ow}) tendem a ficar retidos na membrana de PES, o que não acontece com compostos mais polares, como é o caso dos antibióticos estudados nos primeiros trabalhos sobre o o-DGT.

Com base nisto e sabendo os valores de K_{ow} para as substâncias de interesse neste trabalho (Tabela 8), decidiu-se adotar a configuração do amostrador o-DGT proposta por Challis, Hanson e Wong (2016) nos estudos preliminares envolvendo a determinação do coeficiente aparente (D') dos contaminantes emergentes no gel de agarose. O termo “aparente” é utilizado para indicar que a determinação do coeficiente de difusão não foi feita utilizando uma célula de difusão, mas sim realizada de maneira indireta, ou seja, aplicando os amostradores o-DGT em diferentes tempos de exposição e determinando, posteriormente, a massa das substâncias difundida pelo gel de agarose.

A massa (M) de cada substância difundida pelo gel de agarose foi calculada utilizando a equação (3), onde C_e representa a concentração do analito eluído do disco de HLB, V_e é o volume final do solvente no vial e f_e o fator de eluição de cada substância obtido após o estudo de dessorção das substâncias do disco de HLB (item 4.6.1).

$$M = \frac{C_e V_e}{f_e} \quad (3)$$

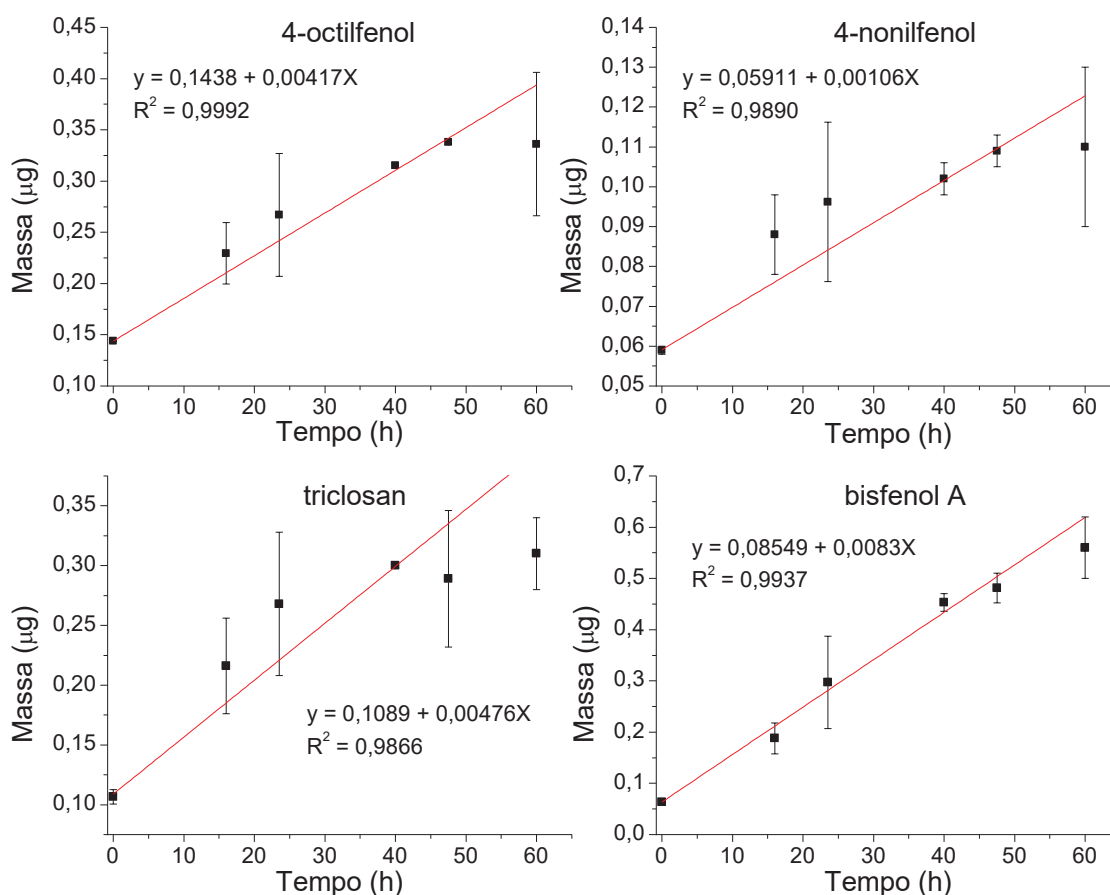
Realizando este estudo em laboratório, a concentração de cada substância na solução teste (C) torna-se conhecida, além da espessura da camada de difusão (Δg) e a área de exposição (A) serem constantes, assim é possível rearranjar a equação (1) para a equação (4).

$$D' = \frac{k \Delta g}{C A} \quad (4)$$

Sendo (k) o coeficiente angular obtido da correlação linear entre a massa difundida do analito (M) e o tempo de aplicação do amostrador (t), como

apresentado na Figura 16, foi possível calcular o coeficiente de difusão aparente por meio da equação (4).

FIGURA 16. OBTENÇÃO DO COEFICIENTE ANGULAR POR MEIO DA CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE A MASSA DA SUBSTÂNCIA DIFUNDIDA PELO GEL E O TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO AMOSTRADOR α -DGT NA TEMPERATURA DE 25 °C, FORÇA IÔNICA DE 0,01 MOL L⁻¹ E pH 6,0.



FONTE: O autor (2017).

O valor do coeficiente de determinação para as quatro substâncias foi superior a 0,98 e os valores calculados de D' para o 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A foram $2,95 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $0,750 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $3,37 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $4,69 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

Na literatura é possível encontrar coeficientes de difusão para algumas classes de substâncias orgânicas no gel de agarose, contudo estes foram determinados utilizando uma célula de difusão. Chen *et al.* (2013) determinaram o

coeficiente de difusão para diversos antibióticos, sendo que os valores variaram de $0,58 \times 10^{-6}$ a $6,24 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ na temperatura de 25°C . Para alguns fármacos e pesticidas, valores de $1,02$ a $4,74 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 5 , 13 e 23°C foram encontrados (Challis, Hanson e Wong, 2016).

Zheng *et al.* (2014) determinaram o coeficiente de difusão de alguns bisfenóis, entre eles o bisfenol A, por meio da célula de difusão e também pela aplicação de amostradores o-DGT. O bisfenol A apresentou um coeficiente de difusão de $5,03 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e coeficiente de difusão aparente de $4,78 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, o qual é bem próximo do valor encontrado neste experimento. Os valores de coeficientes de difusão para algumas substâncias orgânicas são ligeiramente menores em comparação aos coeficientes de espécies metálicas. Segundo Chen, Zhang e Jones (2012), esse menor valor pode ser devido ao tamanho maior das moléculas orgânicas.

O controle da temperatura durante a determinação do D' é muito importante, pois é conhecido que esse parâmetro possui influência direta na difusão das substâncias pelo gel de agarose. Deste modo, a partir do D' obtido na temperatura de 25°C (D_{25}), é possível calcular o coeficiente de difusão (D_t) em diferentes temperaturas (t , em $^\circ\text{C}$) utilizando a equação (5) (CHEN *et al.*, 2013).

$$\log D_t = \frac{1,37023(t - 25) + (8,36 \times 10^{-4})(t - 25)^2}{109 + t} + \log \frac{D_{25}(273 + t)}{298} \quad (5)$$

Quando o amostrador é aplicado em amostras reais não é possível controlar a temperatura, sendo apenas conhecida a temperatura média durante a amostragem. Por essa razão, a correção do D' se torna fundamental para que não ocorram problemas de subestimativa ou superestimativa do valor da concentração da substância no ambiente.

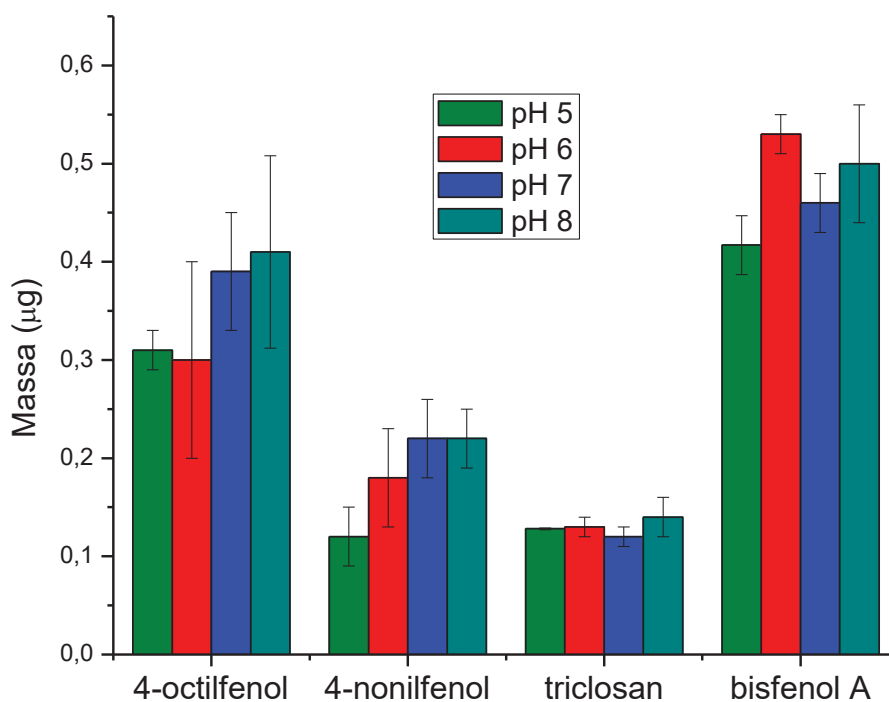
Também foi avaliada a capacidade de sorção do gel de agarose diante dos contaminantes emergentes em estudo. Para isso, foi empregada a etapa de dessorção nos géis de agarose empregados como gel difusivo no amostrador o-DGT durante a determinação do coeficiente de difusão. Não foi observado um aumento na sorção das substâncias pelo gel no intervalo de tempo empregado e, também, o

valor médio da massa dessorvida do gel para todas as substâncias foi inferior a 1% da massa total disponível na solução em que foram expostos. Portanto, este teste mostrou que o gel de agarose poderia ser utilizado como gel difusivo no o-DGT visando a determinação do 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A sem interferir na sorção dos mesmos pelo disco de HLB.

4.8 EFEITO DO pH E FORÇA IÔNICA NA SORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade do o-DGT em matrizes aquosas, o amostrador foi empregado em diferentes valores de pH e força iônica. Geralmente o pH encontrado em águas naturais está na faixa de 5 a 9, sendo que a força iônica pode variar de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (águas superficiais) até $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (água do mar) (CHEN, ZHANG e JONES, 2012). O desempenho do o-DGT variando o pH e força iônica pode ser observado nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

FIGURA 17. VALORES MÉDIOS DAS MASSAS DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS PELA FASE LIGANTE NA FAIXA DE pH ESTUDADO (n=3).



FONTE: O autor (2017).

A partir dos resultados obtidos foi realizada a análise de variância (ANOVA) de fator único para cada uma das substâncias. Foi encontrada diferença significativa na sorção em função do pH para o 4-nonilfenol e bisfenol A ($F_{\text{cal}} = 6,61$ e $F_{\text{calc}} = 5,23$, respectivamente) para um nível de confiança de 95% ($F_{\text{tab}} = 4,07$). Apesar de não apresentar diferença significativa para o 4-octilfenol, vale ressaltar os altos desvios padrão entre as réplicas para este composto, diferente do triclosan que apresentou uma maior precisão entre as réplicas.

Chen, Zhang e Jones (2012) também avaliaram o desempenho do o-DGT, contendo como fase ligante a resina XAD18 imobilizada em agarose, na amostragem do antibiótico sulfametoxazol em valores de pH de 5 a 9. Os autores não observaram diferença significativa na sorção acima do pH 6,2, no entanto o o-DGT proporcionou maiores valores de concentração do sulfametoxazol quando em pH 5. Estes valores de pH poderiam ter causado uma mudança na especiação do antibiótico e, deste modo, afetado a difusão da substância pelo gel difusivo ou a interação com a resina XAD18.

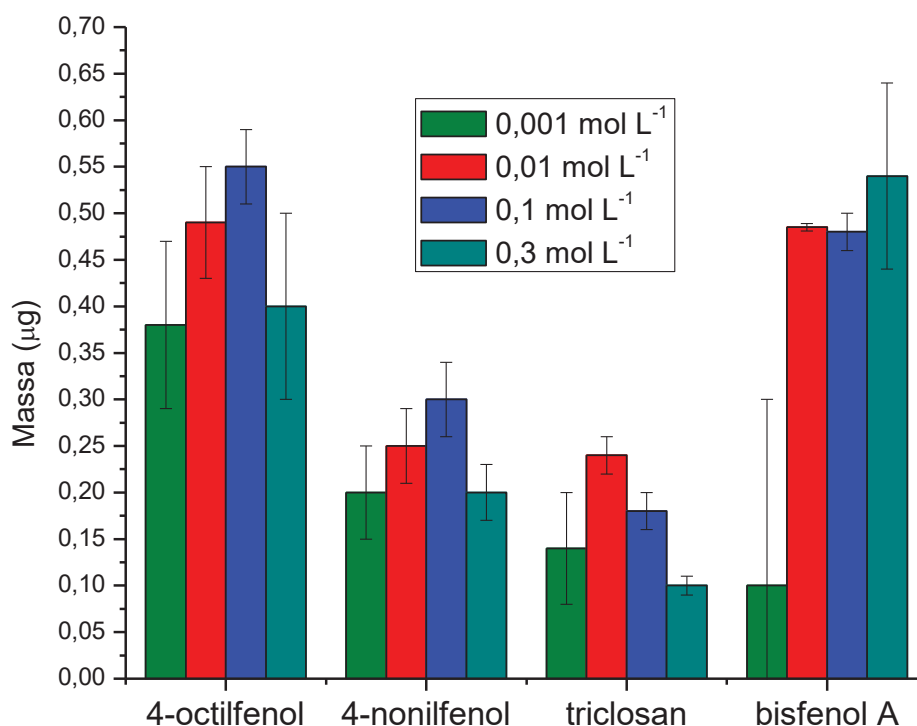
Para compreender esse comportamento, Chen, Zhang e Jones (2012) mediram o coeficiente de difusão para o sulfametoxazol e também avaliaram a capacidade de sorção da fase ligante na faixa de pH previamente estudada. Não foi observada diferença significativa nos valores de coeficiente de difusão quando variado o pH (ANOVA, nível de confiança de 95%), porém foi constatado uma maior capacidade de sorção do antibiótico pela fase ligante em pH 5. Assim, foi comprovado que a diferença no desempenho do o-DGT se deu por mudanças na sorção do composto pela fase ligante, sendo que a XAD18 apresenta como principal mecanismo de sorção as interações hidrofóbicas e, assim, moléculas neutras são preferencialmente mais sorvidas pela resina, enquanto moléculas de sulfametoxazol que apresentam cargas negativas em pH maiores sofreriam repulsão eletrostática (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2011).

As quatro substâncias estudadas neste trabalho apresentam grupo funcional hidroxila e, dependendo do pH em que estão presente, podem ser encontradas como compostos orgânicos carregados positivamente ou negativamente. De acordo com os valores de pKa dessas substâncias (Tabela 8) e da faixa de pH estudado, não era esperado mudança estrutural e, assim, não deveria haver efeito no processo de sorção. Todavia, para alguns compostos houve um aumento na sorção quando o

pH foi aumentado (4-octilfenol e 4-nonilfenol) e para outros (triclosan e bisfenol A) não foi observado uma tendência de aumento ou diminuição.

Variando a força iônica do meio também foi encontrado diferenças na sorção dos compostos pela HLB, conforme apresentado na Figura 18. A ANOVA de fator único foi realizada e encontrada diferença significativa na sorção em função da força iônica para o 4-nonilfenol, triclosan e bisfenol A ($F_{\text{cal}} = 5,15$; $F_{\text{cal}} = 17,3$ e $F_{\text{calc}} = 32,6$; respectivamente) para um nível de confiança de 95% ($F_{\text{tab}} = 4,07$). A maioria das substâncias foram menos sorvidas pela HLB na maior força iônica estudada, ao contrário do bisfenol A que apresentou menor valor médio da massa sorvida em menor força iônica.

FIGURA 18. VALORES MÉDIOS DAS MASSAS DAS SUBSTÂNCIAS SORVIDAS PELA FASE LIGANTE NA FAIXA DE FORÇA IÔNICA ESTUDADA (n=3).



FONTE: O autor (2017).

A HLB é constituída por um polímero lipofílico (divinilbenzeno) combinado com um polímero hidrofílico (n-vinilpirrolidina), sendo um dos sorventes mais usados em SPE e amostragem passiva. Contudo, há pouca informação sobre o

comportamento de partição de diferentes substâncias orgânicas na HLB em sistemas aquáticos (JEONG, SHAFFER e SMITH, 2017).

Nesta vertente, Jeong, Shaffer e Smith (2017) investigaram a influência de fatores como temperatura, pH e força iônica no equilíbrio de sorção de compostos pertencentes a diferentes classes, como fármacos e biocidas, na HLB. Os autores contataram que a sorção das substâncias pela HLB é dependente do pH do meio, sendo atribuído ao aumento do potencial negativo na resina em valores maiores de pH e que poderiam levar a atrações e respulsões eletrostáticas. Para alguns compostos foi observado uma diminuição na sorção com o aumento da força iônica, sendo a possível causa deste comportamento a competição entre os íons provenientes do sal adicionado e as substâncias orgânicas pelos sítios de sorção na HLB.

Com base nos trabalhos presentes na literatura, é possível inferir que a diferença na sorção encontrada neste trabalho possa ser devido aos efeitos na partição das substâncias na HLB quando presente em diferentes condições da matriz aquosa. Contudo, mais estudos são necessários para compreender melhor os efeitos do pH e força iônica na sorção pela HLB imobilizada no gel de agarose, principalmente para as espécies químicas de interesse nesse trabalho.

4.9 APLICAÇÃO DO AMOSTRADOR o-DGT EM MATRIZES AQUOSAS

No segundo trabalho envolvendo o desenvolvimento da técnica o-DGT, Chen *et al.* (2013) propuseram algumas recomendações para a aplicação deste amostrador em amostras reais visando a determinação de compostos orgânicos. Embora seja esperado que o o-DGT forneça a concentração média da substância independente do tempo de amostragem, tempos menores que 20 dias são recomendados com o intuito de evitar a acumulação de biofilme na superfície do amostrador, o que poderia influenciar significativamente na difusão dos compostos para o interior do o-DGT.

Também, seria recomendado o tempo mínimo de aplicação de 7 dias para compostos orgânicos que são encontrados em ambientes aquáticos em baixas concentrações. Deste modo, através do processo de pré-concentração que o amostrador fornece, seria possível a determinação da substância por uma técnica analítica adequada (CHEN *et al.*, 2013). Por essa razão, foi decidido empregar o

tempo de 7 dias de amostragem para a determinação de contaminantes emergentes em água de torneira e de rio.

Após o período de exposição, a fase ligante foi retirada do o-DGT e passou pela etapa de dessorção para que, assim, as substâncias fossem determinadas e quantificadas por GC-MS/MS. A partir das concentrações foram encontradas as massas de cada substância e empregada a equação (2) para calcular a concentração nas amostras reais. O fator de concentração para o procedimento de dessorção e tempo de amostragem empregados foi obtido comparando os valores de concentração da substância no vial determinada por GC-MS/MS e a concentração calculada com a equação (2), sendo possível observar esses valores e as concentrações encontradas para os contaminantes emergentes, tanto na água de torneira quanto na água de rio, na Tabela 9.

TABELA 9. CONCENTRAÇÕES DOS CONTAMINANTES EMERGENTES OBTIDAS APÓS 7 DIAS DE AMOSTRAGEM COM O o-DGT NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE TORNEIRA E ÁGUA DE RIO.

Substância	Água de torneira (ng L ⁻¹) (n = 6)	Água do rio Iraí (µg L ⁻¹) (n = 6)	Fator de concentração
4-octilfenol	102 ± 22	11 ± 6	60
4-nonilfenol	403 ± 78	10 ± 5	15
Triclosan	226 ± 16	0,6 ± 0,4	70
Bisfenol A	250 ± 20	0,05 ± 0,02	100

FONTE: O autor (2017).

Analisando o fator de concentração para cada substância, é possível inferir que este valor mantém uma relação com o seu coeficiente de difusão no gel de agarose empregado como gel difusivo no o-DGT. O 4-nonilfenol possui o menor valor de D' , logo apresentou o menor fator de concentração. A mesma premissa vale para o bisfenol A, o qual possui o maior D' e consequentemente maior fator de concentração. Mais estudos são necessários para afirmar se apenas o coeficiente de difusão da espécie é responsável por esse comportamento ou, ainda, se o processo de sorção pela HLB após a difusão do composto pelo gel também possui alguma influência.

Todas as espécies de interesse foram encontradas nas amostras de água de torneira e de rio. Na amostra de água de torneira, o 4-nonilfenol foi quem apresentou

maior concentração e o 4-octilfenol a menor. Já para a amostra de rio, o 4-octilfenol e o 4-nonilfenol foram encontrados em maior concentração, sendo os valores bem próximos um do outro, e o bisfenol A apresentou a menor concentração.

Os alquilfenóis (4-octilfenol e 4-nonilfenol) são constituintes de produtos industriais e domésticos como detergentes, plastificantes e herbicidas. Além disso, o octilfenol e o nonilfenol são empregados na produção de seus derivados etoxilatos (etoxilatos de alquilfenol), um dos principais surfactantes não iônico utilizado (NAVARRO *et al.*, 2010). Portanto, devido ao seu amplo uso, uma quantidade significativa destes compostos pode estar sendo introduzida nos ambientes aquáticos, o que justificaria as concentrações encontradas neste estudo.

O bisfenol A vem sendo amplamente utilizado em produtos plásticos como brinquedos, recipientes plásticos para água e comida, equipamentos esportivos e eletrônicos, podendo ser liberado para o meio ambiente através do seu uso e manuseio (GEENS *et al.*, 2010; STAPLES *et al.*, 1998). No entanto, o bisfenol A apresentou a menor concentração em água de rio, o que pode ser explicada por sua característica em ser rapidamente degradado no ambiente. Dorn, Chou e Getempo (1987) estudaram a biodegradação do bisfenol A em águas superfícies, onde constataram uma diminuição de 96% na concentração dessa substância entre 3 a 5 dias e apresentou um tempo de meia-vida de 2,5 a 4 dias.

O triclosan foi encontrado, em ambas as amostras, numa concentração intermediária quando comparada as demais concentrações. Contudo, essa substância é um agente antimicrobiano amplamente adicionado na composição de diversos produtos de higiene e cuidado pessoal e, devido ao seu uso generalizado nos últimos 30 anos, passou a ser um dos compostos mais frequentemente detectado em efluentes de estação de tratamento (SIDDIQUE, KUBWABO e HARRIS, 2016)

Como as doses máximas de exposição para estas substâncias não são conhecidas, não é possível saber se as concentrações encontradas estariam acima ou abaixo do permitido. Contudo, apenas a presença destes compostos, especialmente na água de torneira, seria um indicativo de que as ETE's não são capazes de eliminar completamente essas substâncias. Deste modo, mesmo que em baixas concentrações, o consumo ou exposição a essas substâncias durante longos períodos de tempo poderiam representar um risco à saúde da biota aquática e seres humanos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Entre os modos de aquisição de dados do GC-MS/MS, o modo MRM forneceu uma maior detectabilidade para as substâncias 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan, e bisfenol A. Desta forma, utilizando o método obtido no modo MRM foi possível a construção de uma curva analítica visando a quantificação dessas substâncias.

A imobilização das diferentes fases sorventes no gel de agarose foi realizada, onde se constatou que a dispersão da C_{18} no gel não foi eficaz devido, provavelmente, ao caráter hidrofóbico desse material, o que poderia resultar em problemas de reprodutibilidade na confecção dos discos. Já a fase sorvente HLB apresentou melhor dispersão no hidrogel devido ao seu caráter hidrofílico e, conseqüentemente, sua imobilização foi melhor sucedida, podendo ser empregada como a fase ligante no o-DGT.

Diante disto, testes envolvendo a sorção do 4-octilfenol, 4-nonilfenol, triclosan, e bisfenol A foram realizados e constataram uma alta capacidade de sorção do disco de HLB para estes compostos. Por meio do estudo da etapa de dessorção, verificou-se que três eluições com 3 mL de acetonitrila/metanol (2:1, v/v) com 2 min de sonicação em cada eluição proporcionou uma maior média da massa dessorvida, além de proporcionar uma estimativa do fator de eluição para as substâncias.

O gel de agarose foi utilizado como gel difusivo no o-DGT, onde foi possível determinar o coeficiente de difusão aparente para as espécies químicas de interesse. O bisfenol A apresentou um valor de D' muito próximo ao relatado na literatura, já para o 4-octilfenol, 4-nonilfenol e triclosan ainda não há trabalhos realizados nesta vertente para nível de comparação, contudo os valores encontrados de D' são próximos aos valores para substâncias orgânicas pertencentes a outras classes de contaminantes emergentes.

O amostrador o-DGT proposto neste trabalho foi aplicado, de maneira pioneira, em diferentes matrizes aquosas e foi constatada a presença de contaminantes emergentes em amostras de água de torneira e de rio. Ainda, estes resultados evidenciam deficiências na remoção destes compostos pelas atuais estações de tratamento, podendo não ser uma realidade apenas de Curitiba e região metropolitana, mas de todo o Brasil.

Diante desses aspectos, é possível concluir que o amostrador o-DGT desenvolvido neste estudo apresentou os princípios necessários requeridos pela técnica DGT, proporcionando a determinação de substâncias orgânicas pertencentes a algumas classes de contaminantes emergentes em matrizes aquosas e, deste modo, o objetivo geral deste trabalho foi alcançado.

6 REFERÊNCIAS

- AHEL, M.; GIGER, W. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. **Chemosphere**, v. 26, n. 8, p. 1461-1470, 1993.
- ALVAREZ, D. A.; PETTY, J. D.; HUCKINS, J. N.; JONES-LEPP, T. L.; GETTING, D. T.; GODDARD, J. P.; MANAHAN, S. E. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1640-1648, 2004.
- AMDANY, R.; CHIMUKA, L.; CUKROWSKA, E. Determination of naproxen, ibuprofen and triclosan in wastewater using the polar organic chemical integrative sampler (POCIS): A laboratory calibration and field application. **Water SA**, v.40, n. 3, p. 407-414, 2014.
- BLEDZKA, D.; GRYGLIK, D.; MILLER, J. S. Photolytic degradation of 4-tert-octylphenol in aqueous solution. **Environment Protection Engineering**, v. 35, n. 3, p. 235-247, 2009.
- BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1-3, p. 229–246, 2009.
- BUFFLE, J.; HORVAI, G. **In situ monitoring of aquatic systems: Chemical analysis and speciation**, in **IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems**. 6^a ed. Editora John Wiley and Sons, 2000.
- BUSTILLOS, O.; SASSINE, A.; MARCH, R. **A espectrometria de massas quadrupolar**. Editora Scortecci, 2003.
- CHALLIS, J. K.; HANSON, M. L., WONG, C. S. Development and calibration of an organic-diffusive gradients in thin films aquatic passive sampler for a diverse suite of polar organic contaminants. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 10583-10591, 2016.
- CHEN, C.-E.; ZHANG, H.; JONES, K. C. A novel passive water sampler for in situ sampling of antibiotics. **J. Environ. Monit.**, v. 14, n. 6, p. 1523–1530, 2012.
- CHEN, C. E.; ZHANG, H.; YING, G. G.; JONES, K. C. Evidence and recommendations to support the use of a novel passive water sampler to quantify antibiotics in wastewaters. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 23, p. 13587–13593, 2013.
- CHOSTAK, C. L.; DE CAMPOS, M. S.; DA SILVA, S. B.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Dispositivos DGT modificados com materiais alternativos para uso na especiação de elementos traço. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 356–363, 2015.

COLAÇO, C. D.; NOZOMI, L.; YABUKI, M.; et al. Diffusion Coefficients of Metals in Non-Conventional Materials (Agarose and Cellulose Acetate) Used in the Diffusive Gradients in Thin Films Technique. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1360–1364, 2012.

COLLINS, CAROL H. BRAGA, GILBERTO L. BONATO, P. S. B. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, editora Unicamp, 2006.

COM. Report from the Commission to the European Parliament and the Council on the Implementation of the Water Framework Directive (2000/60/EC) River Basin Management Plans. European Commission. 2012. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2012:0670:FIN:EN:PDF>>. Acesso em 03/02/2017.

DAMS, R.; HUESTIS, M. A.; LAMBERT, W. E.; MURPHY, C. M. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 11, p. 1290–1294, 2003.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New Jersey, editora John Wiley & Sons, 2007.

DAVISON, W.; ZHANG, H. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. **Nature**, v. 367, n. 6463, p. 546–548, 1994.

DOMÍNGUEZ, J. R.; GONZÁLEZ, T.; PALO, P.; CUERDA-CORREA, E. M. Removal of common pharmaceuticals presente in surfasse Waters by Amberlite XAD-7 acrylic-ester-resin: Influence of pH and presence of other drugs. **Desalination**, v. 269, p. 231-238, 2011.

DOS ANJOS, V. E. **Desenvolvimento e Avaliação de Sensores Baseados em Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração(DGT) para o Estudo de Especificação de Metais em Águas Naturais**, 187 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

DOS ANJOS, V. E.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Determination of labile species of As(V), Ba, Cd, Co, Cr(III), Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, V(V), and Zn in natural waters using diffusive gradients in thin-film (DGT) devices modified with montmorillonite. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, v. 409, n. 7, p. 1963-1972, 2017.

FARRÉ, M. LA; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 991–1007, 2008.

FATTA, D.; ACHILLEOS, A.; NIKOLAOU, A.; MERIÇ, S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 515–533, 2007.

GANAN, J.; MORANTE-ZARCERO, S.; PEREZ-QUINTANILLA, D.; SIERRA, I. A novel hybrid mesostructured silica for the solid-phase extraction of estrogenic hormones from waters. **Analytical Methods**, v. 7, n. 11, p. 4740–4749, 2015.

GEENS, T.; APELBAUM T. Z.; GOEYENS, L.; NEELS, H.; COVACI, A. Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 27, n. 11, p. 1627-1637, 2010.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 2015.

GROVE, C.; LIEBENBERG, W.; PREEZ, J. L.; YANG, W.; VILLIERS, M. M. Improving the aqueous solubility of triclosan by solubilization, complexation, and in situ salt formation. **Journal of Cosmetic Science**, v. 54, p. 537-550, 2003.

HALKET J.M.; ZAIKIN V.G. Silylation. **European Journal of Mass Spectrometry**. v. 9, n. 1, p. 1-21, 2003.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: Principles and Applications**. 3^a ed. Editora John Wiley & Sons, 2007.

IBGE. Atlas do Saneamento 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.sh>. Acesso em: 05/02/2017.

ICPR. Strategy for micro-pollutants - Strategy for municipal and industrial wastewater, 2010. Disponível em <<http://www.iksr.org/en/topics/pollution/micropollutants/strategy>>. Acesso em 03/02/2017.

JEONG, Y.; SCHAFFER, A.; SMITH, K. Equilibrium partitioning of organic compounds to OASIS HLB as a function of compound concentration, pH, temperature and salinity. **Chemosphere**, v. 174, p. 297-305, 2017.

JIANG, J.; ZHOU, Z.; SHARMA, V. K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water – A review from global views. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 292-300, 2013.

JOHNSON, J.; YOST, R. Tandem mass spectrometry for trace analysis. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 7, 1985.

KOSKY, P. E.; GUGGENHEIM, E. A. The aqueous phase in the interfacial synthesis of polycarbonates. Ionic equilibria and experimental solubilities in the BPA-NaOH-H₂O system. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 30, n. 3, p. 462-467, 1991.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2354–2366, 2009.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. CRC Press, 2005.

LOHMANN, R.; MUIR, D. Global aquatic passive sampling (AQUA-GAPS): Using passive samplers to monitor POPs in the waters of the world. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 3, p. 860–864, 2010.

MACHADO, K. C. **Contaminantes químicos emergentes em águas naturais e de abastecimento público: desenvolvimento analítico e estudo de caso envolvendo capitais estaduais do Brasil**. 2015. 138 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

MACHADO, K. C.; GRASSI, M. T.; VIDAL, C.; PESCARA, I. C.; JARDIM, W. F.; FERNANDES, A. N.; SODRÉ, F. F.; ALMEIDA, F. V.; SANTANA, J. S.; CANELA, M. C.; NUNES, C. R. O.; BICHINHO, K. M.; SEVERO, F. J. R.; A preliminary Nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138-146, 2016.

MACHADO, I; GÉREZ, N.; PISTÓN, M.; HEINZEN, H.; CESIO, M. V. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC-MS and LC-MS/MS using the same QuEChERS procedure. **Food Chemistry**, v. 227, p. 227-236, 2017.

MAIA, D.; DEZOTTI, M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

MAO, Z.; ZHENG, X.; ZHANG, Y.; TAO, X.; LI, Y.; WANG, W. Occurrence and biodegradation of nonylphenol in environment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 491-505, 2012.

MONTASERI, H.; FORBES, P. B. C. A review of monitoring methods for triclosan and its occurrence in aquatic environments. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 221-231, 2016.

NAVARRO, P.; BUSTAMANTE, J.; VALLEJO, A.; PRIETO, A.; USOBIAGA, A.; ARRASATE, S.; ANAKABE, E.; PUY-AZURMENDI, E.; ZUOLOAGA, O. Determination of alkylphenols and 17beta-estradiol in fish homogenate. Extraction and clean-up strategies. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 38, p. 5890-5895, 2010.

PETROVIĆ, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685–696, 2003.

PIETROGRANDE, M. C.; BASAGLIA, G. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1086–1094, 2007.

POERSCHMANN, J.; TROMMLER, U.; GÓRECKI, T. Aromatic intermediate formation during oxidative degradation of Bisphenol A by homogeneous sub-stoichiometric Fenton reaction. **Chemosphere**, v. 79, p. 975-986.

RAGHAV, M.; SUSANNA EDEN, K.; MITCHELL, B. W. **Contaminants of Emerging Concern in Water Raise many questions**, Water Resources Research Center, 2013.

RAIMUNDO, C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. 172 F. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; TURNES-CAROU, I. MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Membrane assisted solvent extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of alkylphenols in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 46-53, 2013.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 713, n. 1, p. 61–90, 1998.

SHIMADZU. Operation Guide: Method Development. Japão, 2014.

SIDDIQUE, S.; KUBWABO, C.; HARRIS, S. A. A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women. **Emerging Contaminants**, v. 2, p. 204-219, 2016.

SISSOM, E. L.; PITTS, R. D. **Elements of Transport Phenomena**, LTC, Rio de Janeiro, 1979.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; COUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. Editora Thompson, 2006.

STAPLES, C. A.; DORN, P. B.; KLECKA, G. M.; O'BLOCK, S. T.; HARRIS, L. R. A review of the environmental fate, affects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 36, n. 10, p. 2149-2173, 1998.

TIXIE, C.; SINGER, H. P.; CANONICA, S.; MULLER, S. R. Phototransformation of triclosan in surface waters: a relevant elimination process for this widely used biocide – laboratory studies, field measurements, and modeling. **Environmental Science Technology**, v. 36, p. 3482-3489, 2002.

VRANA, B.; ALLAN, I. J.; GREENWOOD, R.; et al. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 845–868, 2005.

USEPA. United State Environmental Protection Agency. Contaminants of Emerging Concern. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/cec/>>. Acesso em 02/02/2017.

USGS. United State Geological Survey. Emerging contaminants in the environment. Disponível em: <<http://toxics.usgs.gov/regional/emc/index.html>>. Acesso em 02/02/2017.

WATER JPI. About WaterWorks 2014. Disponível em: <http://www.waterjpi.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=394&Itemid=798>. Acesso em: 03/02/2017.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for data Interpretation**. 4^a ed. Editora John Wiley & Sons, 2007.

ZENOBIO, J. E.; SANCHEZ, B. C.; LEET, J. K.; ARCHULETA, L. C.; SEPÚLVEDA, M. S. Presence and effects of pharmaceutical and personal care products on the Baca National Wildlife Refuge, Colorado. **Chemosphere**, v. 120, p. 750-755, 2015.

ZHANG, H.; BAYEN, S.; KELLY, B. C. Multi-residue analysis of legacy POPs and emerging organic contaminants in Singapore's coastal waters using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 523, n. 1, p. 219–232, 2015.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Performance-Characteristics of Diffusion Gradients in Thin-Films for the in-Situ Measurement of Trace-Metals in Aqueous-Solution. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 19, p. 3391–3400, 1995.

ZHANG, H.; DAVISON, W.; KNIGHT, B.; MCGRATH, S. In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 5, p. 704–710, 1998.

ZHANG, H.; DAVISON, W.; MILLER, S.; TYCH, W. In situ high resolution measurements of fluxes of Ni, Cu, Fe, and Mn and concentrations of Zn and Cd in porewaters by DGT. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 59, n. 20, p. 4181–4192, 1995.

ZHENG, J.; GUAN, D. LUO, J.; ZHANG, H.; DAVISON, W.; CUI, X.; WANG, L.; MA, L. Activated charcoal based diffusive gradients in thin films for in situ monitoring of bisphenols in waters. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 801-807, 2015.